

**Selektive HDAC6-Inhibitoren:**  
**Synthese und biologische Testung**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Universität Regensburg



vorgelegt von

**Elisabeth Grünstein**

aus Moskau

2018

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2014 bis September 2018 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Siavosh Mahboobi am Institut für Pharmazie der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg angefertigt.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht im Dezember 2018.

Tag der mündlichen Prüfung: 01. April 2019

Prüfungsausschuss:	Prof. Dr. S. Dove	(Vorsitzender)
	Prof. Dr. S. Mahboobi	(Erstgutachter)
	Prof. Dr. J. Heilmann	(Zweitgutachter)
	Prof. Dr. J. Wegener	(Drittprüfer)

*Für meine Eltern*

## **Danksagungen**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich während der Promotionszeit begleitet haben. Besonders möchte ich danken:

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Siavosh Mahboobi für die Vergabe dieses sehr interessanten, vielseitigen und herausfordernden Dissertationsthemas, für das entgegengebrachte Vertrauen und die mir gewährte forschersiche Freiheit. Besonders möchte ich mich für die fachliche Unterstützung und das stets offene Ohr in der Anfangszeit der Promotion bedanken, da diese dazu geführt hat, dass ich auch schwierige Aufgabenstellungen meistern konnte. Zudem möchte ich mich für seine sehr wertvollen wissenschaftlichen Anregungen während der gesamten Promotionszeit, seine konstruktive Kritik bei der Durchsicht dieser Arbeit sowie für die Verwirklichung zahlreicher Kooperationen bedanken;

Herrn Prof. Dr. Sigurd Elz für die Möglichkeit an seinem Lehrstuhl promovieren zu dürfen sowie Herrn Prof. Dr. Dr. Wolfgang Wiegrebe für die kritische Durchsicht der Arbeit und für die Bereitschaft den Vorsitz in der mündlichen Prüfung zu übernehmen;

Herrn Prof. Dr. Jörg Heilmann für die stets freundliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei der Durchführung der biologischen Testungen an seinem Lehrstuhl, für die Nutzung von Laborräumen und –geräten, für die Erstellung des Zweitgutachtens sowie seiner Teilnahme am Prüfungsausschuss;

Herrn Prof. Dr. Joachim Wegener für die Bereitwilligkeit das Amt des Drittprüfers zu übernehmen;

Herrn Prof. Dr. Oliver Krämer und Frau Mandy Beyer für die zuverlässige Kooperation, für die Durchführung zellulärer Testungen, für die freundliche Unterstützung bei Fragen rund um die Western Blot-Analysen sowie für die Zurverfügungstellung der graphischen Darstellungen;

Herrn Prof. Dr. Rainer Straub und Herrn Dr. Hubert Stangl für die angenehme Zusammenarbeit, für die fachliche Unterstützung bei den *in vivo*-Studien, für die



Durchführung von Messungen, der statistischen Auswertung sowie für die Zurverfügungstellung der graphischen Darstellungen;

Frau Dr. Birgit Striegl für die gute Zusammenarbeit und die Durchführung der  $\mu$ CT-Messungen.

Herrn Prof. Dr. Jens Schlossmann für die Zurverfügungstellung von Western Blot-Apparaturen; Herrn Prof. Dr. Wolfgang Seufert für die Nutzung des LICOR Odyssey Imagers; Frau Prof. Dr. Ruth Gschwind für die Möglichkeit Laborräume und –geräte zu nutzen;

Herrn Dr. Rudolf Vasold und Frau Simone Strauß für die Durchführung der HPLC-Messungen;

Frau Gabi Brunner für die vielen Hilfestellungen bei der Arbeit in der Zellkultur und für die wertvollen Ratschläge privater und fachlicher Art;

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls Pharmazeutische Biologie, insbesondere Frau Eva Lotter, Frau Julianna Ziegler und Frau Katharina Schiller für die Unterstützung in der Zellkultur, bei den HPLC-Messungen sowie für die Integration in lehrstuhlinterne Veranstaltungen;

Herrn Dr. Herwig Pongratz und Herrn Dr. Emerich Eichhorn für die Unterstützung bei jeglichen chemischen Problemstellungen und das stets angenehme Arbeitsklima;

Herrn Dr. Andreas Sellmer für die ständige Hilfsbereitschaft innerhalb und außerhalb des Labors, für die zahlreichen wertvollen Diskussionen rund um die Synthesen sowie für seine stets freundliche Art, die zu einem sehr guten Arbeitsklima beigetragen hat;

Meinen ehemaligen und derzeitigen Kollegen Herrn Dr. Herwig Pongratz, Herrn Dr. Michel Leonhardt, Bernadette Pilsl, Dr. Steffen Pockes, Aurelia Elz, Lukas Wirth, Sebastian Pitzl, Julia Blüml, Niklas Rosier und Franziska Naporra für das hervorragende Arbeitsklima, die unterhaltsamen Gesprächen in den Mittagspausen, bei den abendlichen Kochaktionen sowie bei den Unternehmungen außerhalb der Universität;

Allen Auszubildenden, die im Rahmen ihrer Ausbildung zu dieser Arbeit beigetragen haben;

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der analytischen Abteilung der Universität Regensburg für die Durchführung der Elementar- und Röntgenstrukturanalysen, für die Aufnahme von NMR-Spektren sowie Herrn Josef Kiermaier für die Hilfsbereitschaft und zuverlässige Aufnahme der MS-Daten;

Frau Uta Hasselmann für ihr stets offenes Ohr bei organisatorischen Problemen;

Herrn Tony Murphy für die graphische Unterstützung;

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, meinem Freund und meinen besten Freundinnen. Ich danke euch für eure liebevolle und durchweg ermutigende Art, für eure Geduld und euren großartigen Rückhalt in allen Situationen. Ohne eure Unterstützung hätte die Arbeit in dieser Form nicht entstehen können.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	2
1.1	Das Zusammenspiel von DNA und Histonen	2
1.2	Epigenetische Modifikationen	3
1.2.1	Histon-Acetyltransferasen	4
1.2.2	Histon-Deacetylasen	5
1.3	HDAC6 - eine besondere Histondeacetylase	8
1.3.1	Subzelluläre Verteilung und struktureller Aufbau	8
1.3.2	Substrate und ihre physiologische Bedeutung	9
1.3.2.1	Der Einfluss auf das mikrotubuläre System	9
1.3.2.2	Einfluss auf den Proteinabbau unter zellulären Stressbedingungen	11
1.3.2.3	Die antioxidative Wirkung	12
1.3.3	Die pathogenetische Bedeutung bei diversen Erkrankungsprozessen	12
1.3.3.1	Die Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen	13
1.3.3.2	Die Rolle bei malignen Erkrankungen	14
1.3.4	HDAC-Inhibitoren	16
1.3.4.1	Unselektive HDAC-Inhibitoren	16
1.3.4.1.1	<i>Trichostatin A (TSA, 2)</i>	18
1.3.4.1.2	<i>Etinostat (MS-275, 6)</i>	19
1.3.4.2	Selektive HDAC6-Inhibitoren	20
1.3.4.2.1	<i>Tubacin (8)</i>	21
1.3.4.2.2	<i>Ricolinostat (9)</i>	22
1.3.4.2.3	<i>Tubastatin A (10)</i>	22
1.3.4.2.4	<i>Nexturastat A (11)</i>	22
1.3.4.2.5	<i>HPOB (12)</i>	22
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	25
2.1	Struktureller Aufbau von HDAC-Inhibitoren	26
2.2	Planung der Synthese	28
<b>3</b>	<b>Chemischer Teil</b>	32
3.1	Synthese der Inhibitoren mit Kopfgruppe 1	32
3.2	Synthese des Hydrolyseprodukt-Analogons aus der Metabolisierungsstudie	38

3.3	Synthese des Inhibitors mit Kopfgruppe 2 .....	39
3.4	Synthese des Inhibitors mit Kopfgruppe 3 .....	41
3.5	Synthese der Inhibitoren mit Kopfgruppe 4 und 5 .....	43
3.6	Synthese des Inhibitors mit Kopfgruppe 6 .....	46
3.6.1	Scaffold Hopping .....	46
3.6.2	Charakterisierung von <b>79a</b> und <b>79b</b> mittels 2D-NMR-Spektroskopie .....	53
3.7	Enantioselektive Synthese der Inhibitoren mit Kopfgruppe 1 .....	57
3.7.1	Biotechnologisches Verfahren zur Synthese des enantioselektiven Marbostat-100-Grundkörpers.....	57
3.7.2	Diastereomerentrennung .....	61
3.7.3	Asymmetrische Synthese mittels eines chiralen Katalysators .....	62
3.7.3.1	Allgemeine Vorgehensweise bei den asymmetrischen Synthesen .....	62
3.7.3.2	Asymmetrische Synthese von <i>R</i> - und <i>S</i> -Marbostat-100 ( <b>R-13a</b> und <b>S-13a</b> ) .....	63
3.7.4	Bestimmung der Enantiomerenreinheit mittels <i>S</i> -Anthrylalkohol.....	68
3.7.4.1	Theoretische Grundlagen.....	68
3.7.4.2	Bestimmung der Enantiomerenreinheit am Beispiel von <b>20a</b> , <b>R-20a</b> und <b>S-20a</b> .....	69
3.7.5	Bestimmung der Enantiomerenreinheit mittels chiraler HPLC-Messung .....	72
3.7.6	Ermittlung der absoluten Konfiguration mittels Röntgenstrukturanalyse .....	74
3.7.7	Asymmetrische Synthese der wasserlöslichen Verbindung <b>13h</b> .....	76
<b>4</b>	<b><i>In vitro</i>-Testung: HDAC-Enzym-Inhibitions-Assays.....</b>	<b>82</b>
4.1	Einleitung.....	82
4.1.1	Bedeutung der Enzym-Inhibitions-Assays.....	82
4.1.2	Cheng-Prusoff-Gleichung .....	83
4.2	Ergebnisse .....	84
4.2.1	HDAC6-Inhibitoren mit Kopfgruppe 1.....	85
4.2.2	HDAC6-Inhibitoren mit Kopfgruppen 2-6 .....	89
4.2.3	Stereochemie und biologische Aktivität der HDAC6-Inhibitoren mit Kopfgruppe 1 .....	92
4.2.4	Zusammenfassung der Enzym-Inhibitionsdaten für die Verbindungen mit Kopfgruppen 1-6.....	94
<b>5</b>	<b><i>In vitro</i>-Testung: zelluläre HDAC6-Inhibitions-Assays .....</b>	<b>96</b>
5.1	Einleitung.....	96
5.1.1	Bedeutung der Zellkultur .....	96
5.1.2	Zellzyklus.....	97

5.1.3	Trennung, Transfer und Detektion der Target-Proteine.....	100
5.1.4	Untersuchung der Selektivität und inhibitorischen Aktivität der synthetisierten HDAC6-Inhibitoren.....	100
5.2	Ergebnisse .....	103
5.2.1	Zelluläre Untersuchung von <b>13a-c</b> , <b>13e-g</b> und <b>39</b> .....	103
5.2.2	Zelluläre Untersuchung von <b>13d</b> , <b>13h</b> , <b>74a</b> und <b>74b</b> .....	105
5.2.3	Bestimmung der Wasserlöslichkeit von <b>13h</b> .....	106
5.2.4	Zelluläre Untersuchung von <b>49</b> , <b>61</b> und <b>65</b> .....	107
5.2.5	Zelluläre Untersuchung von <b>32</b> , <b>23a</b> und <b>13h</b> .....	109
5.2.6	Zelluläre Untersuchung von <b>R-13a</b> und <b>S-13a</b> .....	111
5.2.7	Zelluläre Untersuchung von <b>R-13a</b> und <b>S-13a</b> , sowie <b>R-13h</b> und <b>S-13h</b> .....	112
5.2.8	Konzentrations-Wirkungs- und Kinetik-Studie im HDAC6-Inhibitons-Assay .....	113
5.2.9	Evaluierung der Spezifität von Marbostat-100 ( <b>13a</b> ) .....	118
5.2.10	Untersuchungen zur Wirkstärke und Selektivität in Hinblick auf zytotoxische Effekte von Marbostat-100 ( <b>13a</b> ) .....	120
5.2.10.1	Vergleich von Marbostat-100 ( <b>13a</b> ) mit Tubastatin A ( <b>10</b> ) und LBH589 ( <b>3</b> ) - Wirkstärke und Selektivität .....	120
5.2.10.2	Vergleich von Marbostat-100 ( <b>13a</b> ), Tubastatin A ( <b>10</b> ) und MS-275 ( <b>6</b> ) - Zellzyklusverteilung.....	122
5.2.10.3	Einfluss von Marbostat-100 ( <b>13a</b> ) auf Zellwachstum und Apoptose .....	123
5.2.10.4	Evaluierung der Organgängigkeit von Marbostat-100 ( <b>13a</b> ).....	126
<b>6</b>	<b>Metabolisierung</b> .....	128
6.1	Einleitung.....	128
6.1.1	Das Cytochrom P450-System .....	128
6.1.2	Einfluss genetischer Polymorphismen .....	131
6.1.3	Einfluss des Alters .....	132
6.1.4	Einfluss von Krankheiten.....	132
6.1.5	Epigenetische Einflüsse .....	132
6.1.6	Die Phasen der Arzneistoff-Biotransformation.....	133
6.1.6.1	Phase I-Metabolisierung .....	133
6.1.6.2	Phase II-Metabolisierung.....	134
6.1.6.3	Phase III-Metabolisierung .....	137
6.1.7	Auswirkungen des metabolischen Prozesses .....	138
6.1.8	<i>In vitro</i> -Modelle .....	139

6.1.9	Zusammenfassung.....	146
6.2	<i>In vitro</i> -Metabolisierung im mikrosomalen Inkubationssystem.....	149
6.2.1	Das metabolische Inkubationssystem .....	149
6.2.2	Auswahl der Positivkontrolle.....	150
6.3	Ergebnisse .....	151
6.3.1	Der Einfluss der Inkubationszeit auf die Metabolisierung von 7-EC .....	151
6.3.2	Der Einfluss von organischen Lösungsmitteln auf die Stabilität von <b>13h</b> .....	156
6.3.3	Strukturaufklärung der Hydrolyseprodukte (HP-1 und HP-2).....	158
6.3.4	Der Einfluss der „Stopplösung“ auf die Stabilität der Testsubstanz <b>13h</b> .....	162
6.3.5	Metabolisierungsstudie von <b>13h</b> .....	165
6.3.6	Einfluss von <b>13h</b> auf die Metabolisierung der Positivkontrolle 7-EC .....	170
6.3.7	Zusammenfassung der Metabolisierungsstudie .....	175
<b>7</b>	<b>Rheumatoide Arthritis</b> .....	178
7.1	Das Krankheitsbild .....	178
7.1.1	Definition .....	178
7.1.2	Geschichtlicher Hintergrund .....	179
7.1.3	Ätiologie und Pathogenese.....	179
7.1.4	Symptome .....	181
7.1.5	Prognostische Marker .....	183
7.2	Die rheumatoide Arthritis – ein multifaktorielles Geschehen .....	184
7.2.1	Das arthritische Gelenk.....	186
7.2.2	Pathogenese - mögliche Signalwege.....	187
7.2.2.1	Phasen der pathologischen Veränderungen im Gelenk .....	189
7.2.2.2	Rolle der T-Lymphozyten .....	190
7.2.2.3	Rolle der B-Zellen .....	190
7.2.2.4	Rolle der RA-Fibroblasten-ähnliche-Synovialozyten (RASf) .....	190
7.2.2.5	Rolle von TNF $\alpha$ .....	191
7.2.2.6	Rolle von OPG .....	192
7.3	Experimentelle Arthritismodelle .....	194
7.4	Diagnose und diagnostische Maßnahmen .....	199
7.5	Therapie .....	201
7.6	HDAC-Inhibitoren - eine neue Möglichkeit der RA-Therapie?.....	205
7.6.1	Effekt auf die RA-Synovialfibroblasten .....	207

7.6.2	Hemmung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine .....	208
7.6.3	Hemmung der Angiogenese.....	209
7.6.4	Einfluss auf die Knorpel- und Knochendestruktion.....	209
7.7	Voruntersuchungen zur Testung im <i>in vivo</i> -Tiermodell.....	211
7.8	Testung der <i>in vivo</i> -Wirksamkeit von Marbostat-100 ( <b>13a</b> ) und Derivaten .	212
7.9	Ergebnisse .....	215
7.9.1	Untersuchung von Marbostat-100 ( <b>13a</b> ) im Tiermodell .....	215
7.9.2	Untersuchung von <i>R</i> -Marbostat-100 ( <b>R-13a</b> ) und <b>13h</b> zur Optimierung der therapeutischen Effizienz .....	223
7.10	Zusammenfassung der <i>in vivo</i> -Studie .....	229
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	231
<b>9</b>	<b>Chemisch-experimenteller Teil</b> .....	239
9.1	Allgemeine Angaben .....	239
9.2	Chromatographische Methoden .....	242
9.3	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AV1 – 8) .....	246
9.4	Synthese .....	249
9.4.1	Inhibitoren mit Kopfgruppe 1 .....	249
9.4.2	Hydrolyseprodukt-Analogon <b>32</b> .....	281
9.4.3	Inhibitor mit Kopfgruppe 2 .....	282
9.4.4	Inhibitor mit Kopfgruppe 3 .....	286
9.4.5	Inhibitor mit Kopfgruppe 4 .....	291
9.4.6	Inhibitor mit Kopfgruppe 5 .....	296
9.4.7	Inhibitor mit Kopfgruppe 6 .....	299
9.4.8	Verbindungen für die biotechnologische Vorgehensweise.....	306
9.4.9	Ausgangsverbindung für die angestrebte Diastereomerentrennung .....	309
9.4.10	Enantiomere der Inhibitoren mit Kopfgruppe 1 .....	310
9.4.10.1	<i>R</i> - und <i>S</i> - Marbostat-100 ( <b>R-13a</b> und <b>S-13a</b> ).....	310
9.4.10.2	<i>S</i> - und <i>R</i> - wasserlösliche Verbindungen <b>S-13h</b> und <b>R-13h</b> .....	325
9.5	Röntgenkristallographische Daten .....	340
9.5.1	<b>R-104</b> .....	340
9.5.2	<b>S-104</b> .....	347
9.5.3	<b>R-110</b> .....	350
9.5.4	<b>S-110</b> .....	354

<b>10 Pharmakologisch-experimenteller Teil</b> .....	359
10.1 HDAC-Enzym-Inhibitions-Assay.....	359
10.2 Zellkultur .....	361
10.3 Zellulärer HDAC6-Inhibitions-Assay .....	365
10.3.1 Aussäen und Stimulation der Zellen mit den Testverbindungen .....	365
10.3.2 Durchführung der Ernte- und Lysevorgänge der Zellen.....	365
10.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford .....	366
10.3.4 Durchführung der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Herstellung der Gele .....	368
10.3.5 Western Blot .....	369
10.3.6 Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen .....	370
10.4 Bestimmung der Wasserlöslichkeit .....	371
10.5 Materialien und Methoden extern durchgeführter Untersuchungen.....	372
10.5.1 Zellkulturbedingungen .....	372
10.5.2 Isolierung der PBMCs.....	372
10.5.3 Durchflusszytometrie .....	373
10.5.4 Transfektion .....	373
10.5.5 Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Antikörper.....	374
10.6 <i>In vitro</i> -Metabolisierungsstudie von <b>13h</b> in humanen Lebermikrosomen .....	378
10.6.1 Aufbau des Inkubationssystems bei Anwendung der Methode 1 .....	380
10.6.2 Durchführung und Aufbau des Inkubationssystems bei Anwendung der Methode 2 .....	382
10.6.3 Analytische Methoden .....	384
10.6.4 Reinheitskontrolle der Testsubstanz .....	386
10.6.5 Überblick über die Verbindungen in der Datenbank für die Metabolisierungsstudie .....	387
10.6.6 Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Antikörper.....	392
10.7 <i>In vivo</i> - Testung von Marbostat-100 ( <b>13a</b> ), <i>R</i> - Marbostat-100 ( <b>R-13a</b> ) und <b>13h</b> .....	394
10.7.1 Arthritisinduktion, Scoreverteilung und Therapie .....	394
10.7.2 Blutuntersuchungen .....	396
10.7.3 Zytokinbestimmung .....	397
10.7.4 Histologische Untersuchungen .....	397
10.7.5 Micro-Computertomographie - Messungen zur Analyse der morphometrischen Knochenparameter .....	400



10.7.6	Statistische Auswertung der <i>in vivo</i> -Mausstudie .....	401
10.7.7	Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Kits .....	402
<b>11</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>405</b>
11.1	Übersicht über die $^1\text{H}$ -NMR-Spektren.....	405
11.1.1	Allgemeine Angaben.....	405
11.1.2	Darstellung der $^1\text{H}$ -NMR-Spektren.....	405
11.2	Abbildungsverzeichnis.....	420
11.3	Tabellenverzeichnis .....	427
11.4	Literaturverzeichnis .....	430

## Abkürzungsverzeichnis

Neben den üblichen chemischen und physikalischen Abkürzungen werden im Rahmen der Dissertation die folgenden Abkürzungen verwendet:

μCT	Micro-Computertomographie
7-EC	7-Ethoxycoumarin
Å	Angström
Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	ATP-Binding Cassette Transporter
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ac-H3	acetyliertes Histon 3
ACPA	Anti-Citrullinated Protein-peptide Antibodies / Autoantikörper gegen citrullinierte Peptide
ACR	American College of Rheumatology
ac-Tubulin	acetyliertes Tubulin
ADH	Alkoholdehydrogenasen
ADME	Adsorption Distribution Metabolisation Elimination
ADP	Adenosindiphosphat
AIA	Adjuvans-induzierte Arthritis
Ala	Alamethicin
ALDH	Aldehyddehydrogenasen
AML	akute myeloische Leukämie
Anal.	Elementaranalyse
APS	Ammoniumpersulfat
aq	wässrig
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Attenuated Total Reflection
AV	allgemeine Synthesvorschrift(en)
bcl-2	B-Zell-Lymphom 2
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BOP	Benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphat
bp	base pairs
BS	Bone surface
BSA	bovines Serumalbumin
BV	Bone volume
bzw.	beziehungsweise
CAIA	Collagen-Antikörper-induzierte Arthritis
CCDC	Cambridge Crystallographic Data Centre
CCP	citrullinierte zyklische Peptide
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CFA	komplettes Freund Adjuvans
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis
CLL	chronische lymphatische Leukämie
Con A	Concanavalin A
conc.	konzentriert
COSY	Correlation Spectroscopy
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein
CSA	chirales Solvatierungsmittel
CTCL	kutane T-Zell-Lymphome
CYP450	Cytochrom P450
d	Dublett
DBA/1J	Dilute Brown Non-Agouti

DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett vom Dublett
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMARD	Disease-modifying anti-rheumatic drug
DMB	Dynein-Motor-Bindungsstelle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DMMB	1,9-Dimethylmethylenblau
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dt	Dublett vom Triplett
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ee	Enantiomerenüberschuss
EI	Elektronenionisation
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMA	European Medicines Agency
eq	Äquivalente
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrosprayionisation
ESR	Erythrozytensedimentationsrate
EULAR	European League against Rheumatism
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FBS	Fetales Rinderserum
FDA	US Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLS	Fibroblasten-ähnliche-Synovialozyten
FMN	Flavinmononukleotid
FMO	Flavinmonooxygenase
G-6-P	Glucose-6-phosphat
G-6-P-DH	Glucose-6-phosphat dehydrogenase
G6PI	Glucose-6-phosphat-Isomerase
gef.	gefunden
griech.	griechisch
GST	Glutathion-S-Transferasen
h	Hextett/Sextett
H	Histon
HAT	Histonacetyltransferasen
HDAC	Histondeacetylasen
HDAC6i	Histondeacetylase 6-Inhibitor
HDACi	Histondeacetylasen-Inhibitor
HDACis	Histondeacetylasen-Inhibitoren
HIF 1 $\alpha$	Hypoxie-induzierter Faktor 1 $\alpha$
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLM	humane Lebermikrosomen
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HP	Hydrolyseprodukt
HPB	Hexaphenylbenzen
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPOB	<i>N</i> -Hydroxy-4-(-(2-hydroxymethyl)-(phenyl)amino)-2oxoethyl)benzamid
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry (or Spectrum)
HSF 1	Hitze-Schock-Faktor 1
HSP 90	Hitze-Schock-Protein 90

HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HV-Pumpe	Hochvakuum-Pumpe
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
ICFA	inkomplettes Freund Adjuvans
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IPA	idiopathische Polyarthritis
<sup>i</sup> Prop.	Isopropanol
IR	Infrarotspektrometrie
<i>J</i>	Kopplungskonstante (NMR-Spektroskopie)
JAK-Inhibitor	Janus-Kinase-Inhibitor
K	Kontrolle
Kap.	Kapitel
kat.	katalytisch
Kat.-Nr.	Katalognummer
K <sub>i</sub>	Enzym-Inhibitor-Dissoziationskonstante
K <sub>m</sub>	Enzym-Substrat- Dissoziationskonstante
LC-MS	Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
Lit.	Literatur
LM	Lösungsmittel
LPS	Lipopolysaccharide
LRMS	Low-Resolution Mass Spectrometry (or Spectrum)
M	Molekulargewicht
m	Multipllett
<i>m/z</i>	Verhältnis Masse/Ladung
M <sup>+/-</sup>	Molekül-Radikalion
MAO	Monoaminoxidase
MeCN	Acetonitril
MH <sup>+</sup>	protoniertes Molekülion
MHC/HLA	humanes Leukozytenantigen-System
min	Minute(n)
miRNA	microRNA
MMP	Matrix Metalloprotease
M-Phase	Mitose-Phase
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MTX	Methotrexat
n	haploider Chromosomensatz
n.Chr.	nach Christus
n.s.	nicht signifikant
N-1/N-3	Stickstoffatom 1/ Stickstoffatom 3
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NAT	N-Acetyltransferasen
NB	nicht bestimmt
NES	Nuclear Export Signal
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor kappa-light-Chain-Enhancer
NH <sub>2</sub> OTHP	<i>O</i> -(Tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)-hydroxylamin
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NIS	Nuclear Import Signal
NOD	Non Obese Diabetes
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NSAIDs	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development (Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung)
o.	oder
OPG	Osteoprotegerin
p	Pentett/Quintett
p.a.	pro analysi
p16	Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor 2A
p21	Tumorsuppressorgen
p53	Effektorprotein der Apoptose
PAD	Peptidylarginindeiminase
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
pan-HDACi	unselektive HDAC-Inhibitoren
PAPs	3'-Phosphoadenosin 5'-phospho-sulfat
PB	Phenylbutyrat
PBMC	Peripheral Blood Monocytic Cells
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PDE 5	Phosphodiesterase Hemmer 5
PE	Petrolether
PI	Propidiumiodid
Prx	Peroxiredoxin
PS	Phosphatidylserin
PTCL	periphere T-Zell-Lymphom
PTFE	Polytetrafluorethylen
PTMs	post-translationale Modifikationen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
q	Quartett
quart.	quartär/e
RA	rheumatoide Arthritis
RANK	Receptor Activator of NF-κB
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
RASF	RA-Fibroblasten-ähnliche-Synovialozyten
RF	Rheumafaktor
RNA	Ribo nucleic acid
ROI	Region of Interest
RP-1 bzw. RP-2	Reaktionsprodukt 1 bzw. 2
RP-HPLC	reversed phase HPLC
RPMI Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT.	Raumtemperatur
s	Singulett
S	Substratkonzentration
s.	siehe
SC	Säulenchromatographie
SCID	Severe Combined Immuno-Deficiency
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sept	Septett
sGAG	sulfatierte Glukosaminglykane
SIRT	Sirtuine
SLC-Transporter	solute carrier Transporter
SLE	Lypus erythematodes
Smp.	Schmelzpunkt
S-Phase	S-Phase
Std	Stunde(n)
SULT	Sulfotransferasen
T	Temperatur

t	Triplett
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	Tris buffered saline mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<i>tert</i>	tertiär/e
TFA	Trifluoracetic acid
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
t <sub>R</sub>	Retentionszeit
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
TSA	Trichostatin A
UBS	Ubiquitin-Bindungsstelle
UDPGA	Uridin-5'-diphospho- $\alpha$ -D-glucuronsäure
UGT	Uridindiphosphoglucuronoxyltransferasen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
verd.	verdünnt
vgl.	vergleiche
VHL	van Hippel Lindau-Protein
VPA	Valproinsäure
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
ZBG	Zink-bindende Gruppe

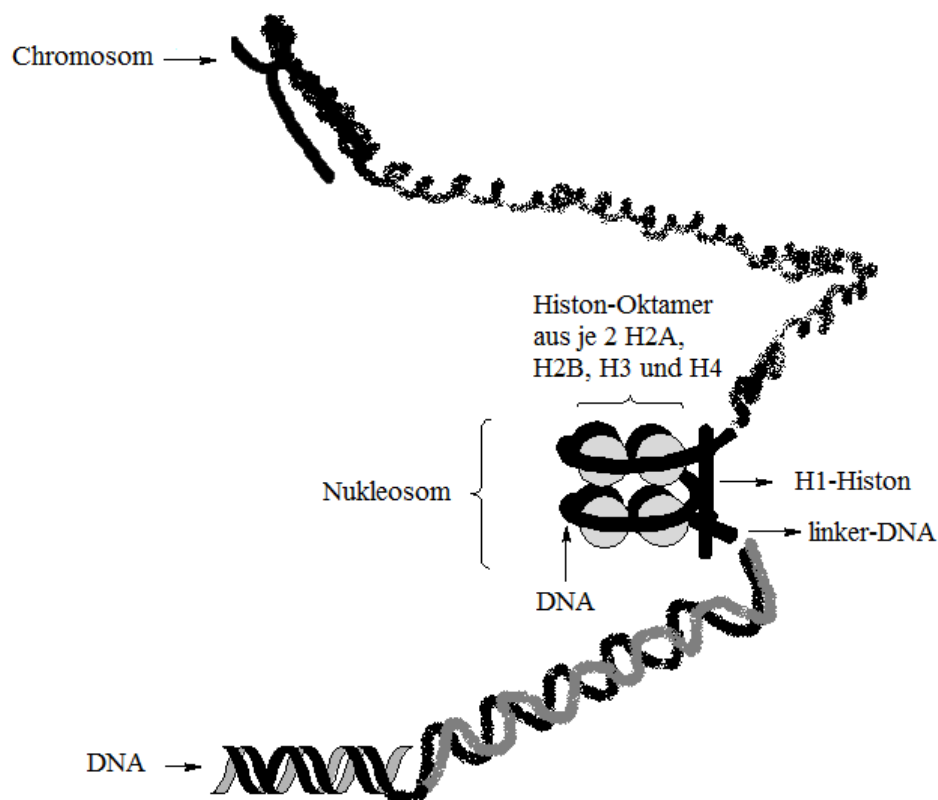
# **Kapitel 1**

## **Einleitung**

# 1 Einleitung

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Synthese von selektiven Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) (s. Kap. 2). Aus diesem Grund wird im Folgenden zunächst auf die Funktion der Histone eingegangen sowie auf die posttranslationalen Modifikationen, denen diese unterliegen, um die Bedeutung, welche diese Enzyme für den Organismus haben, zu erläutern. Im Anschluss daran erfolgen die genaue Beschreibung der zu hemmenden HDAC-Isoform, ihrer Bedeutung bei der Pathogenese von verschiedenen Krankheitsbildern sowie ein Überblick über bereits existierende HDACi.

## 1.1 Das Zusammenspiel von DNA und Histonen



**Abb. 1.1.** Schematische Darstellung der unterschiedlichen Verpackungsmöglichkeiten der DNA.

In eukaryotischen Zellen ist die DNA hauptsächlich in Form von Chromosomen im Zellkern lokalisiert, wobei diese dort als ein Komplex mit Proteinen, hauptsächlich Histonen (basische Proteine), organisiert ist.<sup>1,2</sup> Diese Organisationsform wird als Chromatin bezeichnet.<sup>1</sup> Dabei repräsentiert das Nukleosom die kleinste Einheit aus sich wiederholenden



morphologischen Grundeinheiten des Chromatins.<sup>1,2</sup> Dieses setzt sich aus einem Nukleosomenkern sowie einer linker-DNA zusammen, welche die Verbindung zwischen zwei benachbarten Nukleosomen darstellt.<sup>1</sup> Der Nukleosomenkern besteht seinerseits aus einem Histonoktamer, das aus je zwei Proteinen H2A, H2B, H3 und H4 aufgebaut ist, um das 146 Basenpaare (bp) der DNA gewunden sind.<sup>1,3</sup> Das Histon H1 lagert sich von außen an die DNA und ist für die Verknüpfung der einzelnen Nukleosomen zur nächsthöheren Organisationsform verantwortlich.<sup>1,2</sup>

Die Histone, die unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegen, weisen einen hohen Anteil an positiv geladenen Aminosäuren auf. Daher können sie über starke elektrostatische Wechselwirkungen an die DNA binden, die ihrerseits aufgrund von Phosphatresten im Phosphat-Zucker-Rückgrat negativ geladen ist.<sup>1,4</sup> Die überwiegend Lysin- und Arginin-reichen Histonden bilden den Angriffspunkt für post-translationale Modifikationen (PTMs), die besonders im Bereich von H3 und H4 auftreten.<sup>2</sup>

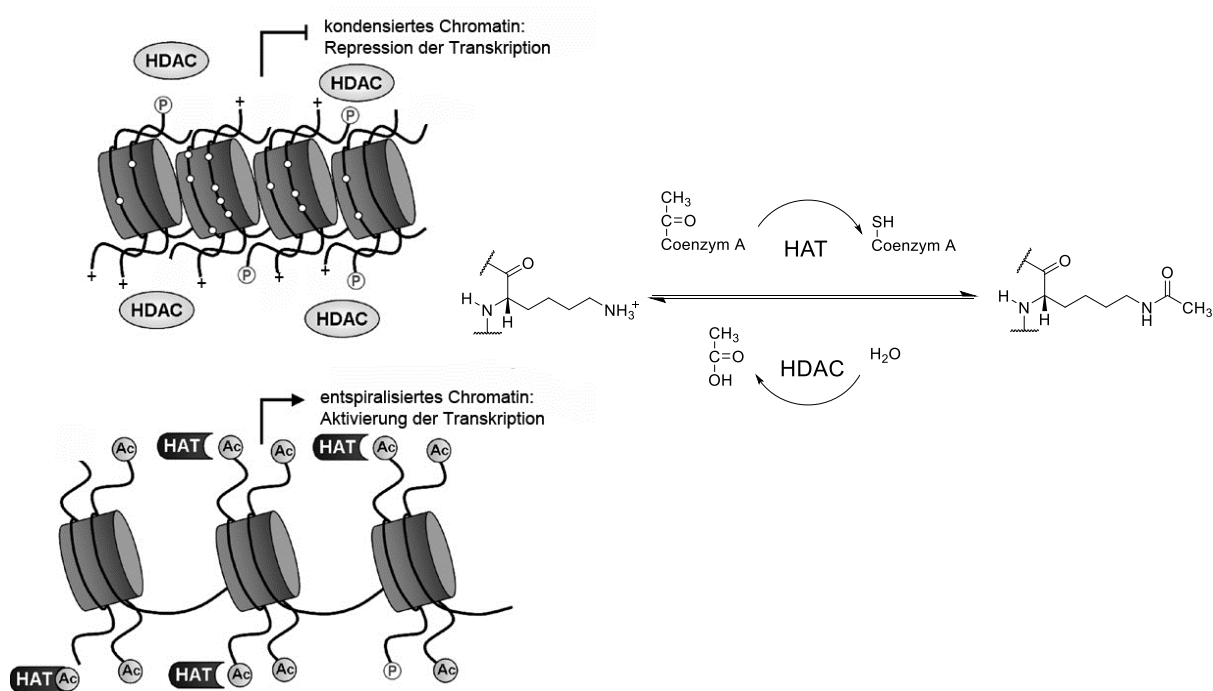
## 1.2 Epigenetische Modifikationen

Der Begriff Epigenetik (griech.: *über die Genetik hinaus*) wird verwendet, um alle Prozesse zu beschreiben, die zu Modifikationen der Genaktivität (Phänotyp) beitragen, ohne die DNA-Sequenz (Genotyp) zu verändern.<sup>5</sup> Epigenetische Vorgänge sind natürliche und essentielle biologische Prozesse, die der Zelle dazu verhelfen, sich adäquat an dynamische Veränderungen der Umwelt anzupassen und dadurch gezielt die Expression von bestimmten Genen ein- und abzuschalten.<sup>5</sup> Treten jedoch Störungen in den epigenetischen Kontrollmechanismen auf, können gravierende gesundheitliche Beeinträchtigungen auftreten (s. Kap. 1.3.3).<sup>5</sup>

Somit spielt die epigenetische Kontrolle eine wichtige Rolle in der Regulation der Genexpression durch kovalente chemische Modifikationen an der DNA, ebenso wie durch kovalente PTMs an Histonen.<sup>6</sup> Bei den kovalenten Histon-Modifikationen handelt es sich um Mechanismen, die der tatsächlichen Transkription vorausgehen und sich in Form von Reaktionen wie Acetylierungen, Deacetylierungen, Phosphorylierungen, Methylierungen und Ubiquitinierungen äußern.<sup>2</sup> Demnach können PTMs die Interaktion zwischen den Histonen und der DNA so beeinflussen, dass sich dies auf Transkriptionsvorgänge der DNA auswirkt.<sup>3,5</sup> Diese Auswirkungen umfassen veränderte Protein-Protein-Interaktionen sowie einen begünstigten oder erschwerten Zugang der basalen Transkriptionsmaschinerie zur DNA.<sup>5</sup>

Im Zuge dieser Arbeit stand der Prozess der Histonacetylierung bzw. Histondeacetylierung im Vordergrund, daher wird im Folgenden diese Möglichkeit der PTM näher erläutert:

Die Histonacetylierung stellt einen reversiblen Prozess dar, der durch Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs) reguliert wird.<sup>3,6</sup> Beide weisen als Target die  $\epsilon$ -Aminogruppe von N-terminalen Lysinresten der Kern-Histone auf, wobei nicht alle Histon-modifizierenden Enzyme ausschließlich diesen Angriffspunkt haben (s. Kap. 1.2.2).<sup>6</sup>



**Abb. 1.2.** Schematische Darstellung des HAT / HDAC-Gleichgewichtes<sup>7</sup> und dessen Auswirkung auf die Regulierung der Genexpression (modifiziert nach Hess-Stumpp *et al.*<sup>8</sup>).

### 1.2.1 Histon-Acetyltransferasen

An dem Prozess der Histonacetylierung sind die Enzyme HATs beteiligt, die Acetylgruppen auf die N-terminalen Lysinreste der Histone übertragen, wobei Acetyl-Coenzym A als Donor für die Acetylgruppe fungiert.<sup>3</sup> Die HATs werden in zwei Klassen (A und B) unterteilt, je nach ihrer intrazellulären Lokalisierung sowie deren Substratspezifität.<sup>9,10</sup> HATs vom Typ A sind im Zellkern lokalisiert und acetylieren dort bevorzugt Histone in den Nucleosomen, wohingegen die HATs vom Typ B im Zytoplasma zu finden sind.<sup>9</sup> Diese acetylieren neu synthetisierte Histone (hauptsächlich H4), bevor sie im Chromatin verpackt werden.<sup>9</sup> Neben den Histonen weisen HATs noch weitere Substrate auf, wie z.B. das Protein Tubulin<sup>3,11</sup> sowie den Transkriptionsfaktor p53.<sup>3,12</sup>

Unter physiologischen Bedingungen geht die negativ geladene DNA eine feste Bindung über die  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysinrestes mit den positiv geladenen Histonen ein.<sup>6</sup> Bei der Übertragung von Acetylgruppen wird deren positive Ladung kompensiert.<sup>6</sup> Dies führt zu einer Schwächung der Wechselwirkung zwischen den basischen Lysin-Resten und der DNA.<sup>3</sup> Als Folge davon kommt es zur Entspiralisierung des dicht gepackten Chromatins, wodurch die Promoterregionen der DNA für Transkriptionsfaktoren zugänglich werden.<sup>6</sup>

Während man früher davon ausgegangen ist, dass die Histonacetylierung stets zu einer Transkriptionsaktivierung führt, so haben neuere Untersuchungen gezeigt, dass der Prozess der Hyperacetylierung nicht nur zu einer ausschließlichen Steigerung der Genexpression beiträgt, sondern auch Effekte auf die Genrepression oder Geninaktivierung hat.<sup>3</sup>

### 1.2.2 Histon-Deacetylasen

Da es sich bei der Histonacetylierung um einen reversiblen Prozess handelt, führen die HDACs als physiologische Gegenspieler der HATs die gegenläufige Reaktion aus.<sup>13</sup> Sie katalysieren die hydrolytische Abspaltung des Acetylrestes und tragen damit dazu bei, dass die Affinität zwischen den protonierten Lysinresten und der DNA wieder zunimmt.<sup>14</sup> Dies führt generell zu einer Repression der Genexpression.<sup>14</sup> Zusätzlich zu den Histonen wurden noch weitere Substrate (50 Nicht-Histon-Proteine) entdeckt, deren Regulation der Acetylierung über die HDACs gesteuert wird.<sup>3,6</sup> Diese lassen sich grob in fünf Bereiche einteilen: DNA-bindende Proteine, Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktionsmoleküle, Chaperone und Proteine, die in DNA-Reparaturmechanismen mitwirken.<sup>3</sup> PTMs an diesen nicht-Histon-Proteinen können demnach eine Vielzahl an regulatorischen Prozessen, wie Genexpression, mRNA-Stabilität sowie Proteinaktivität und -stabilität beeinflussen.<sup>3,13</sup> Daraus wird ersichtlich, dass Abweichungen in der Aktivität und Expression von HDACs und HATs, welche zu einem Ungleichgewicht zwischen Acetylierung und Deacetylierung ihrer Substrate führen, eine signifikante Rolle in der Entstehung von Erkrankungen haben (s. Kap. 1.3.3)<sup>3,13</sup>

Von Allfrey *et al.*<sup>15</sup> wurde 1964 erstmals die Aktivität der HDACs beschrieben und im Jahr 1996 gelang es dann, eine Isoform der humanen HDACs (HDAC 1) zu isolieren und zu identifizieren.<sup>16</sup> Grundsätzlich sind HDACs im Zellkern zu finden, da sich dort ihre Substrate - die Histone - befinden.<sup>4</sup> Für den Transport in den Zellkern benötigen HDACs ein Zellkernimportsignal (*nuclear import signal (NIS)*) sowie ein Zellkernausgangssignal (*nuclear export signal (NES)*) für den Austritt aus dem Zellkern (s. **Abb. 1.3**).<sup>4</sup>

Humane HDACs bestehen aus 18 Enzymen, welche entsprechend ihrer Homologie zu Proteinvorfahren in der Hefe, ihrer subzellulären Verteilung sowie ihrer katalytischen Aktivität in 4 verschiedene Klassen unterteilt werden (Klassen I-IV):<sup>6,13,17</sup>

Klasse I: HDAC1, 2, 3 und 8

Klasse IIa: HDAC4, 5, 7 und 9

Klasse IIb: HDAC6 und 10

Klasse III: Sirtuine

Klasse IV: HDAC11

Zu den „klassischen“ Zink-abhängigen HDAC Enzymen zählen die Klassen I, II und IV sowie die Sirtuine, während die Klasse III die nicht Zink-abhängige Klasse repräsentiert.<sup>3,13</sup>

HDACs der Klasse I weisen eine Homologie zum Transkriptionsregulator RDP3 der Hefe auf.<sup>3,6</sup> Die Vertreter dieser Klasse werden vorzugsweise im Zellkern exprimiert, kommen jedoch auch in den meisten Geweben vor.<sup>18</sup> Während HDAC8 als einziger Vertreter dieser Klasse verstärkt in der glatten Muskulatur zu finden ist, besitzt HDAC3 sogar die Fähigkeit, zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma hin und her zu wandern, da diese Isoform eine NES-Einheit besitzt.<sup>3,14,18</sup> Aufgrund der Tatsache, dass die Klasse I ubiquitär vertreten ist, wird angenommen, dass diese an vielen Regulationsmechanismen innerhalb der Zelle in Form von Transkriptions-Corepressoren beteiligt ist.<sup>3</sup>

Alle Isoenzyme der Klasse II weisen mit Ausnahme von HDAC9 (nur NIS-Einheit) und HDAC10 (nur NES-Einheit), sowohl eine NIS-, als auch NES-Einheit auf, womit ihre subzelluläre Verteilung verdeutlicht wird.<sup>10</sup> Zudem besitzt die gesamte Klasse II ein ausgeprägtes gewebsspezifisches Expressionsmuster (vorwiegend im Herz- und Muskelgewebe lokalisiert) im Vergleich zur Klasse I, deren Vertreter in nahezu allen Gewebstypen zu finden sind.<sup>3,4</sup>

Die Klasse II der HDACs ist homolog mit dem HDA1 der Hefe und lässt sich in zwei Untergruppen (IIa und IIb) unterteilen:<sup>6</sup>

Die Klasse IIa-Enzyme (HDAC4, 5, 7 und 9) können zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma wandern.<sup>6</sup> Des Weiteren lassen sich Unterschiede in der Struktur der Klasse IIa zu anderen HDAC-Klassen feststellen, indem sie zusätzlich zur Zink-abhängigen katalytischen Domäne noch eine weitere Teilstruktur aufweisen, bei der es sich um eine

C-terminale Verlängerung um etwa 500-600 Aminosäuren handelt.<sup>16,19</sup> Diese zweite Teilstruktur ermöglicht es den Vertretern der Klasse IIa, mit anderen Proteinen, wie der HDAC3, sowie mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren zu interagieren.<sup>19</sup>

Die Klasse IIb (HDAC6 und 10) ist hingegen hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert.<sup>19</sup> HDAC6 nimmt innerhalb der HDAC-Familie aufgrund seines strukturellen Aufbaus sowie seiner Substrate eine Sonderstellung ein, wohingegen die Funktion der HDAC10 weiterhin unbekannt ist.<sup>13</sup> Da der Fokus dieser Arbeit auf der Entwicklung von selektiven HDAC6-Inhibitoren (HDAC6i) liegt, wird diese Isoform ausführlich im Kap. 1.3.4.2 beschrieben.

Die Sirtuine (Klasse III-HDACs) sind homolog zur Sir2-Familie der Hefen und benötigen im Gegensatz zu den bisher genannten HDAC-Vertretern für ihren Katalysemechanismus NAD<sup>+</sup> als Cofaktor.<sup>3,20</sup> Derzeit (Stand Juni 2017) sind sieben Isoenzyme (SIRT1-7) beim Menschen bekannt.<sup>21</sup> Eine Besonderheit der Sirtuine ist, dass diese zwei enzymatische Aktivitäten aufweisen: Histondeacetylase und ADP-Ribosyltransferase.<sup>16</sup> Des Weiteren ist ihre Verteilung im Organismus ein interessantes Charakteristikum.<sup>16</sup> SIRT1 und 2 wurden im Zellkern und im Zytoplasma gefunden, wohingegen SIRT3 im Zellkern und in den Mitochondrien zu finden ist.<sup>16</sup> SIRT4 und 5 sind ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert, während SIRT6 nur im Zellkern und SIRT7 im Nucleolus zu finden sind.<sup>16</sup>

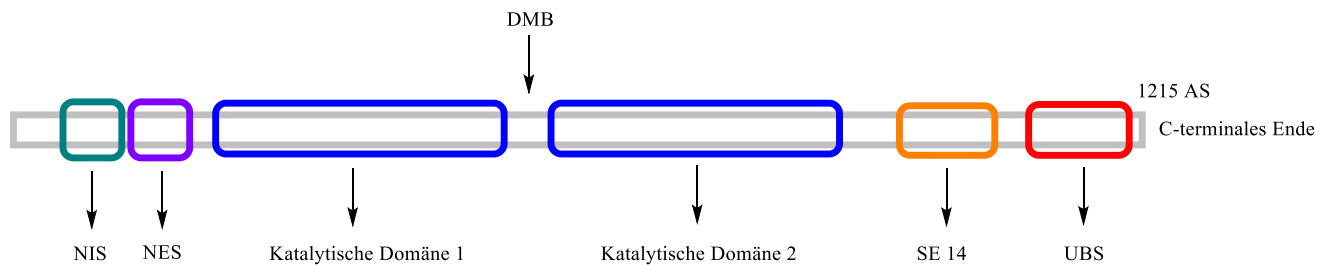
SIRT1 zeigt innerhalb dieser Familie die ausgeprägteste HDAC-Aktivität und ist das meist untersuchte Isoenzym der Klasse III.<sup>16</sup> Ihm werden regulatorische Funktionen im Energiehaushalt, dem Alterungsprozess und dem zirkadianen Rhythmus zugesprochen.<sup>19</sup> Als Target besitzt dieses Isoenzym die Lysinreste der Histone 1, 3 und 4, sowie nicht-Histon-Proteine, wie z.B. den Transkriptionsfaktor p53.<sup>19</sup> SIRT2 kann ebenfalls wie HDAC6 die Acetylgruppen des acetylierten  $\alpha$ -Tubulins katalytisch abspalten.<sup>19</sup> Zu den SIRT3-5 existieren nur wenig Informationen hinsichtlich ihres strukturellen Aufbaus sowie ihrer Substrate.<sup>19</sup>

HDAC11 als einziger Vertreter der Klasse IV ist im Gehirn, Herzen, den Nieren und in der Skelettmuskulatur lokalisiert.<sup>6</sup> Phylogenetische Analysen ergaben, dass HDAC11 strukturell mit der Klasse I, vor allem mit HDAC3 und 8 verwandt ist.<sup>18</sup> Aufgrund seines Verteilungsmusters im Organismus ähnelt dieses Isoenzym jedoch eher der Klasse II HDACs,

weswegen keine eindeutige Zuordnung zu einer bestehenden Klasse vorgenommen werden konnte.<sup>3</sup> Somit bildet dieses Isoenzym eine eigene Klasse.<sup>3</sup>

## 1.3 HDAC6 - eine besondere Histondeacetylase

### 1.3.1 Subzelluläre Verteilung und struktureller Aufbau



**Abb. 1.3.** Proteinstruktur der humanen HDAC6. NIS = Nuclear Import Signal; NES = Nuclear Export Signal; DMB = Dynein Motor Bindungsstelle; SE 14 = Serin-Glutamin Tetrapeptid; UBS = Ubiquitin-Bindungsstelle. Die Zahl gibt die Anzahl an Aminosäuren an. Darstellung in Anlehnung an die Lit.<sup>10</sup>

HDAC6 stellt den größten (1215 Aminosäuren) und am häufigsten exprimierten Vertreter unter den HDAC-Isoformen dar.<sup>13,22</sup> Es ist hauptsächlich im Zytoplasma vorzufinden, kann jedoch bedingt durch einen Zellproliferationsstopp mit Hilfe der NIS-Einheit in den Zellkern transloziert werden.<sup>13,22</sup>

In der Regel handelt es sich dabei um Zellkerne undifferenzierter Zellen, wie embryonale Stammzellen, Nervenzellen und einige Krebsstammzelllinien.<sup>10</sup> Neben der NIS- und NES-Einheiten besitzt HDAC6 eine SE14-Domäne, welche einerseits für die intrazelluläre Retention (Zytoplasma-Verankerung) zuständig ist und andererseits eine Interaktion mit dem Tau-Protein ermöglicht.<sup>24</sup>

HDAC6 ist das einzige Isoenzym innerhalb der Zink-abhängigen HDACs, welches zwei katalytische Domänen besitzt, die ihrerseits wiederum eine Dynein-Motor-Bindungsstelle (DMB) umgeben. Zudem befindet sich C-terminal eine weitere funktionelle Einheit, die Ubiquitin-Bindungsstelle (UBS).<sup>19,20</sup> Beide katalytische Domänen sind funktionsfähig und tragen unabhängig voneinander zur Aktivität des Proteins bei.<sup>22</sup> Es ist jedoch weiterhin unklar, ob eine oder beide für die katalytische Aktivität verantwortlich sind.<sup>19</sup> Während Zhang *et al.*<sup>25</sup> vermuten, dass beide Domänen gleichermaßen an der Aktivität beteiligt sind, konnten Zou *et al.*<sup>26</sup> zeigen, dass die Deacetylierung vom Substrat  $\alpha$ -Tubulin (s. Kap. 1.3.2) hauptsächlich von der C-terminalen Domäne ausgeht.<sup>4,19</sup> Wang *et al.* konnten durch homologes Modelling die Beobachtungen von Zou *et al.* bestätigen, indem sie feststellten,

dass sich die bisherigen experimentellen Erkenntnissen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen nur anhand der zweiten katalytischen Domäne erklären lassen.<sup>19</sup> Um *in vivo* eine Aktivität aufzuzeigen, müssen alle Histondeacetylasen, mit Ausnahme der HDAC6, einen Multiproteinkomplex mit regulatorischen Proteinen formen.<sup>4</sup>

### 1.3.2 Substrate und ihre physiologische Bedeutung

Im Folgenden werden die - vor allem im Hinblick auf die *in vitro*-Untersuchungen - wichtigsten physiologischen zellulären Prozesse beschrieben, auf die HDAC6 einen Einfluss ausübt. Die Einflüsse von HDAC6 auf immunologische Prozesse werden im Rahmen der Arthritis (s. Kap. 7.6) ausführlich beschrieben.

Durch die überwiegende Präsenz im Zytoplasma gehören vorwiegend zytoplasmatische Proteine wie das  $\alpha$ -Tubulin, das Hitzeschockprotein (HSP 90), das Cortactin sowie das Peroxiredoxin zu den wesentlichen Substraten dieser Histondeacetylase.<sup>13,20,27</sup> HDAC6 nimmt eine Schlüsselrolle in der Regulation von mikrotubulären Vorgängen wie Zellmigration und Zell-Zell-Interaktionen ein.<sup>22,27,28</sup> Über die reversible Acetylierung von HSP 90 wird dessen Chaperonaktivität reguliert, welches sich folglich auf die Stabilität von Wachstums- und antiapoptotischen Faktoren auswirkt.<sup>27</sup> Zu diesen Faktoren zählen beispielsweise der Rezeptor für den „Epidermal-Growth-Factor“ (EGFR) sowie die Proteinkinasen (Überträger von Phosphatgruppen).<sup>27</sup>

#### 1.3.2.1 Der Einfluss auf das mikrotubuläre System

Das erste identifizierte Substrat von HDAC6 war das  $\alpha$ -Tubulin, wodurch der erste HDAC6i den Namen Tubacin (Tubulin acetylation inducer) erhielt.<sup>22,23</sup>

Bei den Tubulinen handelt es sich um Proteine, die in sechs Hauptgruppen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ) eingeteilt werden, wobei die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubuline in eukaryotischen Zellen die wichtigsten Formen für die Bildung des Zytoskeletts darstellen.<sup>11</sup> Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubuline formen über nicht-kovalente Bindungen ein Heterodimer, welches sich dann zu Protofilamenten zusammenlagert, um letztlich den zylindrischen Mikrotubulus-Körper zu bilden.<sup>11,23</sup> Mikrotubuli sind an verschiedenen Vorgängen in der Zelle beteiligt, wie z.B. an zytoplasmatischen Transportprozessen, der Kernteilung (mitotischer Spindelapparat) sowie der Zellbewegung.<sup>11,23</sup>

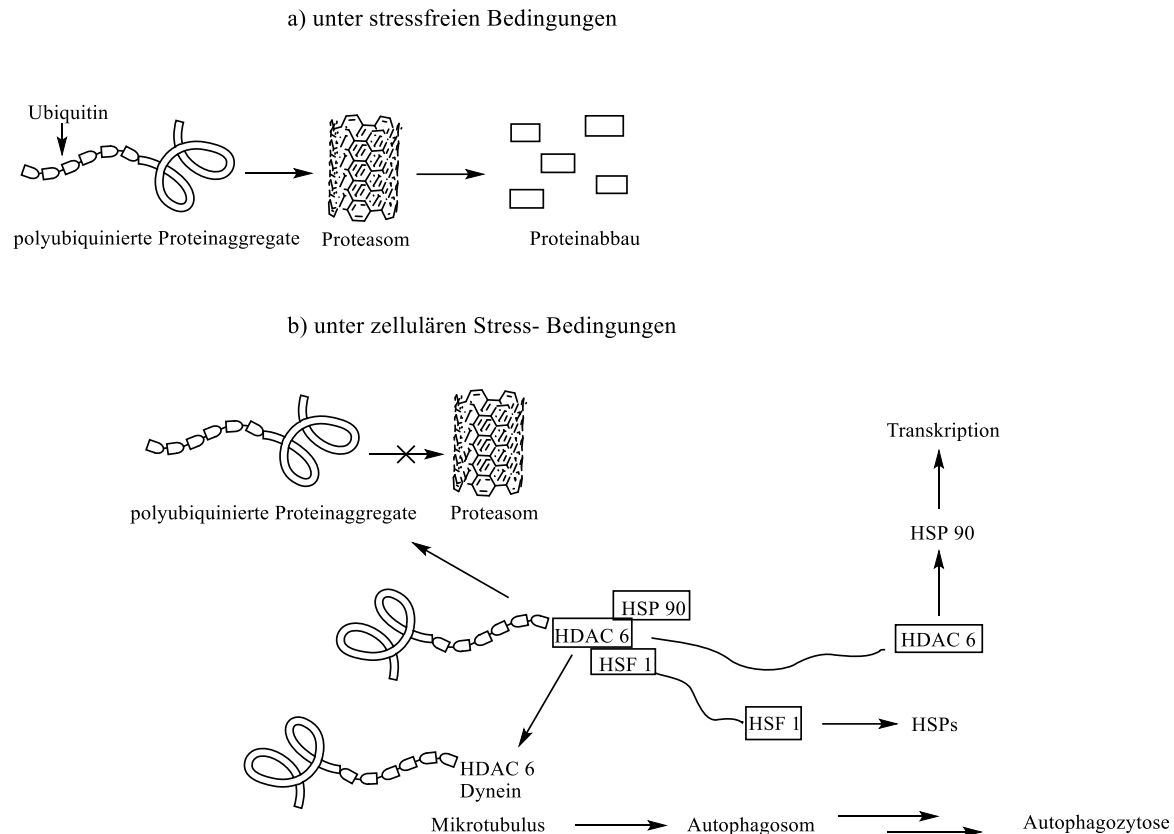
Mikrotubuli sind dynamische Gebilde, die an beiden Außenseiten mit unterschiedlicher Geschwindigkeit wachsen können.<sup>29</sup> Da der Auf- und Abbau der Mikrotubuli nebeneinander stattfindet, spricht man von einer dynamischen Instabilität.<sup>29</sup> Es ist bekannt, dass  $\alpha$ -Tubulin verschiedenen PTMs unterliegt, die die Stabilität des Mikrotubulus beeinflussen. Ein Beispiel hierfür ist der Acetylierungsgrad als indirektes Maß für die Dynamik des Mikrotubulus.<sup>4,11</sup> Die deacetylierte Form des  $\alpha$ -Tubulins ist weniger stabil und neigt daher zur Depolymerisierung.<sup>4,10</sup>

Eine HDAC6-vermittelte Deacetylierung reguliert die Mikrotubulus-abhängige Zellbewegung, wobei noch nicht vollständig geklärt werden konnte, welche der beiden katalytischen Domänen der HDAC6 dafür verantwortlich ist.<sup>22,23</sup> Zusätzlich zu seiner Wechselwirkung mit Tubulin kann HDAC6 mit dem F-Aktin-bindenden Protein Cortactin interagieren.<sup>22</sup> Demnach kann die Zellmigration und -teilung über HDAC6 reguliert werden, indem die Deacetylierung von Cortactin zu dessen Bindung an das F-Aktin führt (Steigerung der Polymerisation) und die Deacetylierung von  $\alpha$ -Tubulin die mikrotubuläre Dynamik erhöht.<sup>10,22</sup>

Aufgrund dieser Zusammenhänge lässt sich erschließen, warum für die Überprüfung der inhibitorischen Fähigkeit eines HDAC6i  $\alpha$ -Tubulin (acetyliertes Tubulin) als Surrogat-Parameter in den *in vitro*-Tests herangezogen wurde.



### 1.3.2.2 Einfluss auf den Proteinabbau unter zellulären Stressbedingungen



**Abb. 1.4.** Darstellung des Einflusses von HDAC6 auf den Proteinabbau unter zellulären Stressbedingungen. A) Unter stressfreien Bedingungen erfolgt der Proteinabbau über das Proteasom. HDAC6 befindet sich dabei mit HSF 1 und HSP 90 in einem Basalkomplex, wodurch HSF 1 inaktiv bleibt. B) Die Hemmung vom Proteasom führt zur Akkumulation von polyubiquinierten Proteinen. HDAC6 bindet diese, und der Basalkomplex dissoziiert, wodurch HSF 1 weitere HSPs aktiviert. Die Proteinaggregate werden durch den Mikrotubulus zu den Aggresomen befördert und die Autophagozytose eingeleitet. HDAC6 kann seinerseits über den Acetylierungsgrad von HSP 90 die Gen-Transkriptionsaktivierung beeinträchtigen. Die Darstellung erfolgt in Anlehnung an die Lit.<sup>23</sup>

Aufgrund seiner Ubiquitin-bindenden Einheit ist HDAC6 in der Lage, polyubiquitierte Proteine zu binden.<sup>23</sup> Dies ist besonders bei zellulären Stress-Situationen von großer Bedeutung.<sup>23</sup> Unter stressfreien Bedingungen erfolgt der Proteinabbau über das Proteasom (s. **Abb. 1.4** (a)).<sup>23</sup> In diesem Fall wird HDAC6 durch die Chaperone (VCP/p97) abgekapselt und bildet einen basalen Komplex mit dem Hitze-Schock-Faktor (HSF) 1 und dem Hitze-Schock-Protein (HSP) 90 (s. **Abb. 1.4** (a)).<sup>23</sup> Dieser Komplex sorgt dafür, dass HSF 1 in seiner inaktiven Form bleibt.<sup>23</sup> Kommt es in der Zelle zu einer Stress-Situation, so können fehlgefaltete Proteine nicht mehr über die Proteasome abgebaut werden und aggregieren in der Zelle (s. **Abb. 1.4** (b)).<sup>23</sup> Diese Aggregate werden über ihre Polyubiquitin-Reste von der Ubiquitinbindungsstelle der HDAC6 erkannt, wodurch der basale Komplex in seine Bestandteile dissoziiert.<sup>23</sup> Das dadurch freigesetzte HSF 1 liegt nun in der aktiven Form vor

und kann somit HSPs aktivieren (s. **Abb. 1.4 (b)**).<sup>23</sup> Dabei handelt es sich um HSP 70 und HSP 27, die eine protektive Wirkung gegenüber den toxischen Proteinaggregaten in der Zelle einnehmen.<sup>24</sup> Durch die Dynein-Bindungsstelle der HDAC6 ist diese in der Lage, die polyubiquinierten Proteine mit Hilfe des Motorproteins Dynein entlang des mikrotubulären Systems (unter Verbrauch von ATP) zu den Aggresomen zu befördern (s. **Abb. 1.4 (b)**).<sup>23,27</sup> Die Aggresome werden ihrerseits zu Autophagosomen umgewandelt, bevor die fehlgefalteten Proteine durch die Lysosomen abgebaut werden können.<sup>10,27</sup> Ferner führt die Deacetylierung von Cortactin (ebenfalls ein HDAC6 Substrat) zur Bindung an das F-Aktin (Bestandteil des Mikrotubulus)<sup>10</sup>, was wiederum zu einer intensiven Polymerisation führt, die mit einer erhöhten Zellmigration sowie der Fusion von Autophagosomen mit den Lysosomen einhergeht.<sup>10</sup> Die durch Cortactin katalysierte Fusion setzt eine vorhergehende HDAC6-Aktivität voraus.<sup>10</sup>

HDAC6 kann zusätzlich noch den Acetylierungsgrad von HSP 90 modulieren, wodurch die Gentranskription von HSP 90 Substraten beeinträchtigt wird (s. **Abb. 1.4 (b)**).<sup>23</sup>

Auf diese Weise ist das HDAC6 Enzym an der Autophagozytose von fehlgefalteten Proteinen beteiligt.<sup>23,27</sup> Diese protektive Wirkung zeigt, dass HDAC6 zusätzlich zu seiner enzymatischen Fähigkeit auch über nicht-enzymatische Effekte verfügt.<sup>10</sup>

### **1.3.2.3 Die antioxidative Wirkung**

Die antioxidativen Enzyme Peroxiredoxin (Prx) 1 und 2 sind, wie bereits am Anfang des Kapitels erwähnt, Substrate der HDAC6 und können reaktive Sauerstoffspezies durch Reduktion abbauen.<sup>30</sup> Die Inhibition von HDAC6 bedingt eine gesteigerte Acetylierung dieser Enzyme (Prxs), wodurch deren Aktivität verstärkt wird.<sup>10</sup> Es wird vermutet, dass damit eine reduzierte Resistenz der Krebszellen gegenüber der Chemotherapie erzielt werden kann.<sup>10</sup>

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass HDAC6 mit einer Vielzahl an Proteinen interagiert, die in den Bereichen der Zellmigration, Immunantwort, Transkription, Abbau fehlgefalteter Proteine sowie Zellproliferation und Zelltod zu finden sind.<sup>22,28</sup>

### **1.3.3 Die pathogenetische Bedeutung bei diversen Erkrankungsprozessen**

Da HDAC6 an der Regulation von zahlreichen Prozessen teilnimmt (s. Kap. 1.3.3 und Kap. 7.6), ist es bei verschiedenen intra-zellulären Signalwegen involviert und demnach an vielen immunologischen und neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt. Auch im Bereich der Onkologie könnte es von großer Bedeutung sein.<sup>6,20, 31</sup> Im Folgenden soll die Rolle der

HDAC6 in den genannten Krankheitsfeldern geschildert und dadurch verdeutlicht werden, warum dieses Isoenzym ein geeignetes therapeutisches Target sein könnte.

### **1.3.3.1 Die Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen**

In gesunden Zellen liegt ein Gleichgewicht zwischen den Aktivitäten der HATs und HDACs vor. Eine Dysregulation konnte in verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet werden.<sup>24</sup> Dabei wird vermutet, dass ein daraus resultierender erniedrigter Histonacetylierungsgrad die Expression von Genen beeinträchtigt, welche in apoptotischen und neuroprotektiven Vorgänge involviert sind.<sup>24</sup> Zu den neurodegenerativen Erkrankungen zählen Alzheimer, Parkinson und Chorea Huntington, die alle durch den Verlust an Nervenzellen gekennzeichnet sind.<sup>24</sup> Die Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen hat bei allen genannten Erkrankungen eine pathogenetische Bedeutung.<sup>24,29</sup> Diesen zytotoxischen Proteinaggregaten wird im Rahmen der Zellantwort durch drei wesentliche Mechanismen entgegengewirkt, in welchen die HDAC6 ebenfalls involviert ist:

- 1) Bindung von polyubiquinierten fehlgefalteten Proteinen.<sup>24</sup>
- 2) Bildung von Aggresomen sowie die darauffolgende Autophagozytose.<sup>24</sup>
- 3) Induktion von HSPs (s. Kap. 1.3.2.2).<sup>24</sup>

Aufgrund der Tatsache, dass bei den Erkrankungen Alzheimer, Parkinson und Chorea Huntington der eigentliche Abbauweg der Proteine über das Ubiquitin-Proteasom-System beeinträchtigt ist, ist der Prozess der Autophagozytose besonders wichtig.<sup>24</sup>

Dem einerseits im Kap. 1.3.2.2 beschriebenen protektiven Effekt von HDAC6 in Bezug auf den Abbau von fehlgefalteten Proteinen steht andererseits die erhöhte Belastung an Tau-Proteinen gegenüber, welche im Wesentlichen über HSP 90 (ein HDAC6 Substrat) reguliert wird.<sup>24</sup> Eine Induktion von HDAC6, um den genannten protektiven Effekt zu steigern, könnte unter pathologischen Bedingungen zu einer Überexpression von HDAC6 führen. Dies hätte letztlich zur Folge, dass HDAC6 in seiner Deacetylase- und Ubiquitin-Ligase-Aktivität durch das Tau-Protein (zytosolisches Mikrotubuli-assoziiertes-Protein) gehemmt wird.<sup>24</sup>

Eine Hemmung von HDAC6 hingegen korreliert mit einem erhöhten Acetylierungsgrad von HSP 90, wodurch es in weiterer Folge zur Abnahme der Tau-Proteinkonzentration kommt.<sup>24</sup> Des Weiteren resultiert aus einer HDAC6-Inhibition eine gesteigerte Tubulinacetylierung, woraufhin das Motorprotein Kinesin 1 an das Tubulin binden kann und somit die zu transportierenden Proteine entlang dem Mikrotubulus befördert werden können.<sup>24</sup> Neben der Verbesserung der axonalen Weiterleitung konnte bei Alzheimer Untersuchungen im Mausmodell gezeigt werden, dass die Abwesenheit von HDAC6 zu einer Verbesserung des assoziativen (gewohnheitsmäßige Verhaltensweisen) und räumlichen Gedächtnisses führt.<sup>24</sup>

### **1.3.3.2 Die Rolle bei malignen Erkrankungen**

Tumorerkrankungen werden durch genomische Veränderungen wie Amplifikationen, Translokationen, Deletionen und Punktmutationen angetrieben.<sup>32</sup> Die Entwicklung von Tumorerkrankungen kann jedoch auch an epigenetische Modifikationen gebunden sein, indem es zu einer Dysregulation dieser Mechanismen kommt.<sup>10</sup> Aufgrund der Tatsache, dass epigenetische Veränderungen bereits in der frühen Phase der Karzinogenese nachgewiesen werden konnten, stellen epigenetische Modulatoren eine neue potenzielle therapeutische Möglichkeit dar, um chemopräventiv basierte Fortschritte gegen Krebs zu erzielen.<sup>10</sup>

Im Folgenden soll das Expressionsmuster von HDAC6 bei ausgewählten Tumorerkrankungen beschrieben und dessen Funktion als Onkogen oder Tumorsuppressor erläutert werden.<sup>10</sup>

Eine Überexpression von HATs induziert den Zelltod durch Apoptose, während die Überexpression von HDACs im Zusammenhang mit pathologischen Veränderungen steht und zu einer Hypoacetylierung der Histone führt.<sup>32</sup> Dadurch kommt es zur Repression von Genen, die an zellulären Prozessen wie der Zellzykluskontrolle und der Apoptose beteiligt sind.<sup>32</sup>

Tatsächlich konnte festgestellt werden, dass die HDAC6 Überexpression mit einem erhöhten aggressiven Tumorverlauf bei der akuten myeloischen Leukämie (AML), bei Ovarialkarzinomen und beim Leberzellkarzinom in Verbindung gebracht werden kann.<sup>10</sup> Beim Ovarialkarzinom lässt sich dieser Zusammenhang darauf zurückführen, dass der HDAC6-vermittelte Proteinabbau über den lysosomalen Signalweg (s. Kap. 1.3.2.2) zu einer Resistenzinduktion gegenüber dem Apoptose-Mechanismus führt.<sup>10</sup> Die Überexpression von HDAC6 trägt bei Vorliegen eines Leberzellkarzinoms hingegen dazu bei, dass es zu einer Beschleunigung der Zellmigration kommt.<sup>10</sup>

Überraschenderweise konnte jedoch auch festgestellt werden, dass HDAC6 auch die Funktion eines Tumorsuppressors ausüben kann, was besonders bei folgenden Tumorerkrankungen der Fall ist: chronische lymphatische Leukämie (CLL), kutane T-Zell-Lymphome (CTCL) sowie beim Lungenkarzinom.<sup>10</sup> Die Überexpression von HDAC6 korreliert bei CLL und CTCL mit einer positiven Krankheitsprognose.<sup>10</sup>

Der Einfluss der HDAC6 im Bereich von malignen Erkrankungen erstreckt sich auf 4 Teilgebiete: Karzinogenese, Zellüberleben, Zellbeweglichkeit sowie Metastierung und Transkriptionsprozesse.<sup>23</sup>

Bei der Karzinogenese ist die Expression von HDAC6 und die dadurch vermittelte HSF 1-Aktivierung für die Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps in etablierten Tumorzellen erforderlich.<sup>23</sup> Dies hängt damit zusammen, dass die durch HSF 1 unter Stress-Bedingungen aktivierten Gene (s. Kap. 1.3.2.2), sich von denen unterscheiden, die in malignen Krebszellen aktiviert werden.<sup>33</sup> Demnach besitzen Krebszellen die Möglichkeit, HSF 1 in einer einzigartigen Art und Weise für sich zu nutzen.<sup>33</sup>

Durch die Anwesenheit von HDAC6 wird das Zellüberleben dadurch gesichert, dass dieses Isoenzym polyubiquinierte Proteinaggregate bindet und über den Aggresom-Signalweg abbaut.<sup>23</sup> Eine HDAC6-Inhibition würde zur Apoptose der Zellen führen, welche insbesondere in Bezug auf Krebszellen notwendig ist, um toxische Ansammlungen innerhalb der Zelle zu vermeiden.<sup>23</sup>

Bei der Entstehung von Metastasen nimmt die Zellmotilität eine Schlüsselrolle ein.<sup>23</sup> Studien dazu haben gezeigt, dass eine Überexpression von HDAC6 die chemotaktisch-induzierte Zellbewegung erhöht.<sup>23,32</sup> Demnach könnten HDAC6i durch Erhöhung des Acetylierungsgrades von Histonen und Transkriptionsfaktoren die Re-Expression von stillgelegten regulatorischen Genen in Krebszellen fördern und somit zur Blockade der invasiven Zellmotilität beitragen.<sup>23,32</sup> Neben einer Auswirkung auf Histone und Transkriptionsfaktoren, führt eine HDAC6-Hemmung auch zu einer Hyperacetylierung von Cortactin, wodurch F-Aktin nicht mehr binden kann und es daraufhin zu einer Beeinträchtigung der Zellmobilität und Zellteilung kommt.<sup>10,23</sup>

Des Weiteren kann eine HDAC6-Inhibition zu einer Hyperacetylierung von Chaperon HSP 90 führen, woraufhin es zu einer Destabilisierung der Interaktion zwischen HSP 90 und dem Androgenrezeptor kommt.<sup>23,31</sup> Der Androgenrezeptor wird häufig als Target für die Behandlung und Prävention von Prostatakrebs herangezogen.<sup>31</sup> Demnach würde eine Destabilisierung dieses Rezeptors zu dessen Abbau über das Proteasomsystem führen und schließlich in einer reduzierten Expression von Genen resultieren, die über diesen Rezeptor assoziiert werden.<sup>31</sup>

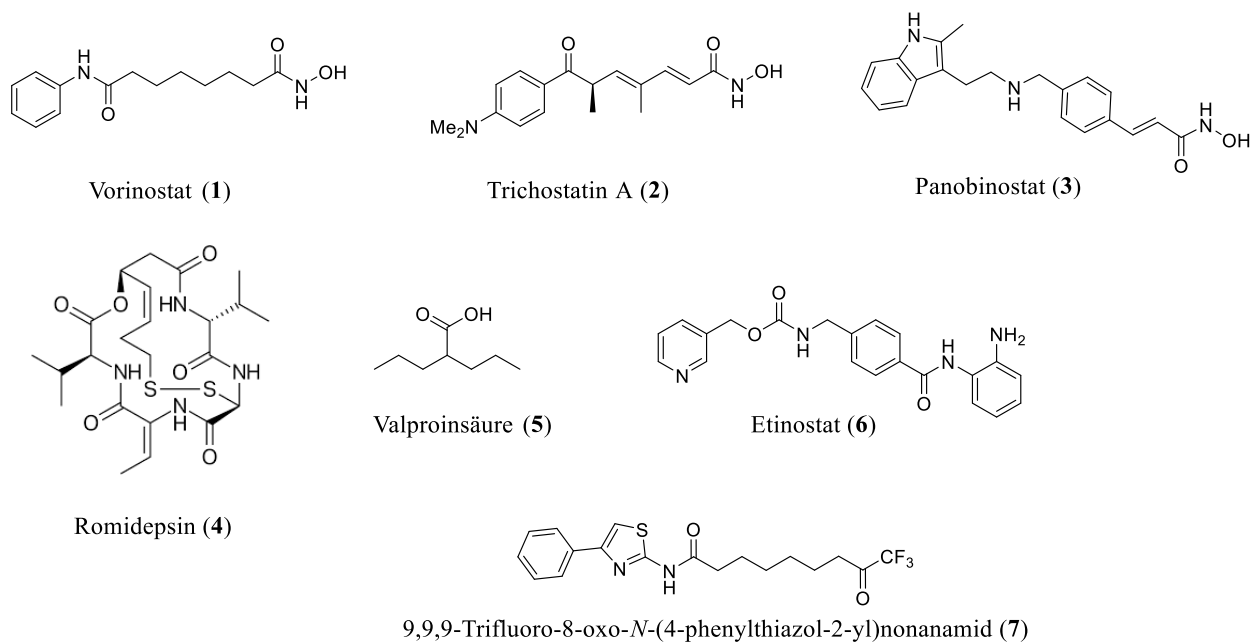
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass HDAC6 an der Regulation von Signalwegen beteiligt ist, die im Rahmen von malignen Krankheiten eine pathogenetische Relevanz haben.<sup>23</sup> Demzufolge kann einer Überregulation der Histondeacetylasen durch den Einsatz von HDACi entgegengewirkt werden.

Derzeit (Stand Januar 2018) sind von der US Food and Drug Administration (FDA) drei unselektive HDACi (pan-HDACi) und ein Klasse I selektiver HDACi zur Behandlung des CTCL, des peripheren T-Zell-Lymphoms (PTCL) sowie des Multiplen Myeloms zugelassen.<sup>13</sup> Zu den pan-HDACi zählen Vorinostat (**1**) (bei CTCL), Belinostat (bei PTCL) und Panobinostat (**3**) (beim Multiplen Myelom), während Romidepsin (**4**) (bei PTCL) der selektive Klasse I Inhibitor ist.<sup>13,34</sup> Nach vorliegenden Daten tragen diese epigenetischen Modulatoren mit einem adjuvanten Effekt zur klassischen Krebstherapie bei.<sup>10</sup>

### **1.3.4 HDAC-Inhibitoren**

#### **1.3.4.1 Unselektive HDAC-Inhibitoren**

Die Familie der HDACi umfasst natürlich vorkommende sowie synthetisch erzeugte Substanzen. Sie entfalten ihre Funktionen durch die Blockade der Aktivität von Histondeacetylasen, indem sie mit der katalytische Domäne dieser Enzyme interagieren.<sup>3</sup> Die Wirkung von HDACis wird dabei über eine Modulation der Genexpression infolge einer Hyperacetylierung von Histonen vermittelt.<sup>3</sup> Es existieren eine Reihe diverser Substanzen, die sich in ihrer Struktur, der biologischen Aktivität sowie ihrer Spezifität unterscheiden.<sup>3</sup> Basierend auf ihrer chemischen Struktur können sie in 5 Klassen unterteilt werden (s. **Abb. 1.5**):



**Abb. 1.5.** Darstellung einer Auswahl unselektiver HDACi mit Vertretern aus jeder Strukturklasse.

- Hydroxamsäure-Derivate (Vorinostat (SAHA, **1**), Givinostat, Abexinostat, Trichostatin A (TSA, **2**), Panobinostat (**3**), Belinostat)
- zyklische Tetrapeptide (Depsipeptide wie Romidepsin (FK-228, **4**), Apicidin, Trapoxin)
- Carbonsäuren mittlerer Kettenlänge (Valproinsäure (VPA, **5**), Phenyl- und Natriumbutyrat)
- synthetische Benzamide (Mocetinostat (MGCD0103), Etinostat (MS-275, **6**))
- Ketone (Trifluormethylketone, z.B. **7**)<sup>3,14</sup>

Die Vertreter der Hydroxamsäure-Derivate, Benzamide und zyklische Peptide weisen eine inhibitorische Aktivität im nanomolaren Bereich auf, sodass die meisten Inhibitoren in diesen Gruppen wiederzufinden sind.<sup>3</sup> Generell üben die Hydroxamsäure-Derivate eine nicht-spezifische HDAC-Hemmung aus, indem sie eine Aktivität gegenüber vielen HDAC-Klassen aufweisen.<sup>3</sup> Hingegen weisen Carbonsäuren mittlerer Kettenlänge, wie VPA (**5**) und die Butyrat eine bevorzugte Hemmung gegenüber der Klasse I und IIa HDACs auf.<sup>3</sup> Isotyp-selektive HDACi werden im Kap. 1.3.4.2 beschrieben.

Bei den meisten HDACi einschließlich derjenigen, die sich in klinischen Studien befinden, handelt es sich um Verbindungen, die eine reversible Hemmung über kompetitive Mechanismen hervorrufen.<sup>4</sup> Es sind jedoch auch einige wenige irreversible Inhibitoren bekannt.<sup>4</sup> Irreversible Inhibitoren besitzen als Zink-bindende Gruppe (ZBG) (s. Kap. 2.1) eine elektrophile Gruppe, in der Regel ein Keto-Epoxid, welche kovalent an nukleophilen Resten,

wie Histidin, Tyrosin und Aspartat in der aktiven Bindungsstelle binden können.<sup>4</sup> Experimentell konnte anhand des zyklischen Tetrapeptids Trapoxin eine irreversible HDAC-Hemmung gezeigt werden.<sup>4</sup>

Obwohl generell die Histon-Hyperacetylierung mit einer Transkriptionsaktivierung in Verbindung gebracht wird, führt eine HDAC-Hemmung nicht unbedingt zu einer generellen Erhöhung der Gentranskription.<sup>3</sup> Es wird geschätzt, dass etwa 20 % aller bekannten Gene über die HDACs beeinflusst werden und von diesen die Hälfte hoch- und die andere Hälfte herunterreguliert wird.<sup>3</sup>

Die zelluläre Antwort auf HDACis ist komplex und umfasst sowohl die Transkription betreffende, als auch nicht-transkriptionsbezogene Prozesse, wodurch neben der Genexpression auch noch zelluläre Vorgänge moduliert werden können.<sup>3</sup> Dabei ist einerseits zu erwähnen, dass HDACis in der Lage sind, Apoptose zu induzieren, indem sie die Expression antiapoptotisch wirkender Gene wie dem des B-Zell-Lymphoms 2 (bcl-2) reduzieren.<sup>35</sup> Andererseits tragen sie durch die verstärkte Transkription von Genen, die an der Proliferationskontrolle (Tumorsuppressorgen, p21) beteiligt sind, dazu bei, dass die Zellzyklusprogression gehemmt wird.<sup>3,36</sup> Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass HDACis durch die Induktion der Acetylierung von Nicht-Histonproteinen direkt mit den Effektorproteinen der Apoptose (p53) interagieren können.<sup>37</sup>

An dieser Stelle sollen die unselektiven HDACi TSA (2) und MS-275 (6) hervorgehoben werden, da diese im Rahmen der *in vitro*-Untersuchungen als Referenzsubstanzen dienen.

#### **1.3.4.1.1 Trichostatin A (TSA, 2)**

1990 wurde TSA (2) identifiziert und ursprünglich als fungistatische Substanz aus *Streptomyces hygroscopicus* isoliert.<sup>14</sup> Damit zählt TSA (2) zu den ersten entdeckten Naturstoffen mit HDAC-inhibierender Wirkung.<sup>14</sup> Dieses Molekül bewirkt eine Histon- und Tubulinacetylierung und zeigt eine ausgeprägte zytotoxische Wirkung (Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest) gegenüber Krebszellen durch die Hemmung aller Zink-abhängigen HDACs (Klasse I und II).<sup>14</sup> Zudem konnte *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass TSA (2) bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich eine spezifische und reversible Hyperacetylierung der Histone bewirkt.<sup>38</sup> Aufgrund von schlechten pharmakokinetischen Eigenschaften konnte TSA (2) bisher nicht erfolgreich in klinischen Studien eingesetzt werden.<sup>14,39</sup> Jedoch wird es häufig als Referenzsubstanz für die Entwicklung von synthetischen, analog wirksamen Verbindungen herangezogen.<sup>14,40,41</sup>



#### 1.3.4.1.2 Etinostat (MS-275, 6)

Wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, hemmen die meisten HDACis eine Vielzahl von HDACs. Mit dem Aminobenzamid MS-275 (6) konnte jedoch ein HDACi identifiziert werden, der eine Klassen-spezifische Hemmung aufweist.<sup>8,14</sup>

*In vitro*-Untersuchungen haben ergeben, dass es sich bei MS-275 (6) um einen potenten HDACi der Klasse I-Enzyme handelt, wobei sich das inhibitorische Wirkprofil auf die Isoformen HDAC1-3 erstreckt, wohingegen HDAC8 kaum beeinträchtigt wird.<sup>8</sup> Des Weiteren haben die *in vitro*-Untersuchungen gezeigt, dass MS-275 (6) anti-proliferative Aktivität in verschiedenen humanen Krebszellen aufweist und damit eine Anwendung *in vivo* bei Krebs-Subtypen, wie Leukämie, Brustkrebs, Lungenkrebs und Pankreaskrebs und Multiples Myelom denkbar ist.<sup>8,42</sup> Diese anti-proliferative Aktivität ist dadurch bedingt, dass MS-275 (6) eine Hyperacetylierung der Histone H3 und H4 hervorruft, welche das Tumorsuppressorgen p21 induzieren und zu einem Zellzyklusabbruch in der G<sub>1</sub>-Phase führt.<sup>8,14</sup>

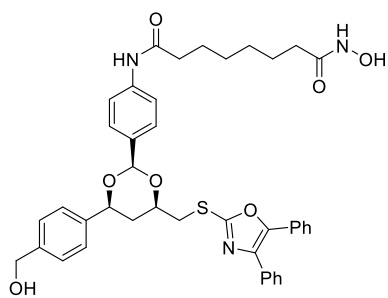
Aufgrund des guten Wirkprofils *in vivo* und *in vitro* befindet sich MS-275 (6) derzeit (Stand Juni 2017) in der Phase III Studie für die Zulassung zur Behandlung von Brustkrebs.<sup>43</sup>

Ergebnisse aus den Phase I- und II-Studien zeigen, dass pan-HDACi eine Vielzahl von verschiedenen Nebenwirkungen hervorrufen können, wobei das Toxizitätsprofil zwischen den verschiedenen pan-HDACi variieren kann.<sup>44,45</sup> Hier sind zu nennen: Diarrhöe, Gewichtsverlust, Veränderungen des Elektrolythaushaltes, Veränderungen bei der Blutgerinnung sowie kardiovaskuläre Störungen (QT-Zeit-Verlängerung).<sup>3,44,45</sup> Dieses Nebenwirkungsprofil ist jedoch nicht verwunderlich, wenn das breite Wirkspektrum der HDACs berücksichtigt wird.<sup>44</sup> Sie regulieren nämlich nicht nur die Chromatinstruktur, sondern können durch PTMs eine Vielzahl an Proteinen in verschiedenen Zelltypen in ihrer Aktivität beeinflussen.<sup>44</sup>

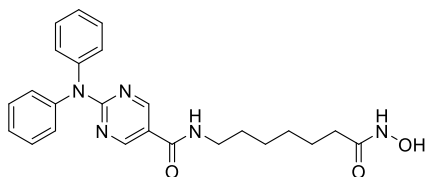
Daher ist es für die weitere Entwicklung von HDACis entscheidend zu evaluieren, ob selektive HDACis gegenüber einem pan-HDACi in ihrer inhibitorischen Aktivität vergleichbare Effizienz aufweisen und gleichzeitig zu einer Reduktion von Nebenwirkungen führen.<sup>20,44,45</sup>

### 1.3.4.2 Selektive HDAC6-Inhibitoren

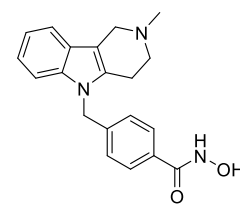
Das wachsende Interesse an selektiven HDAC6i findet seinen Ursprung darin, dass dieses Enzym, wie bereits im Kap. 1.3.3 beschrieben, in die Genese verschiedener Krankheiten eingreift und damit ein potenzielles therapeutisches Target darstellt.<sup>22</sup> Molekularbiologische Untersuchungen ergaben, dass selektive HDAC6i weder zu signifikanten Veränderungen der Genexpression führen, noch die Zellzyklusprogression beeinflussen.<sup>22</sup> Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Mäuse, bei denen die HDAC6 durch genetische Manipulation gezielt deaktiviert wurde (*knock-out-Maus*), keine Entwicklungsstörungen oder Organversagen aufwiesen.<sup>13,22</sup> Diese Beobachtung suggeriert, dass eine selektiver HDAC6i keine Auswirkungen auf die Viabilität hat und - im Vergleich zu den Klasse I HDACi - ein geringeres Nebenwirkungspotenzial zu erwarten ist.<sup>22,34</sup> Aufgrund der zytoplasmatischen Deacetylase-Aktivität der HDAC6 üben selektive HDAC6i ihren Effekt auf zelluläre Vorgänge aus.<sup>22</sup> Daher sind nur geringe Veränderungen in epigenetischen Prozessen, die auf dem Mechanismus der Histonacetylierung beruhen, zu erwarten.<sup>4,22</sup> Dies wird zusätzlich durch die Erkenntnis gestützt, dass von den beiden katalytischen Domänen der HDAC6 die C-terminale Seite für die Deacetylierung von Tubulin verantwortlich ist.<sup>4</sup> Dadurch wird bei der Gabe eines selektiven HDAC6i bevorzugt die Tubulin-Deacetylase-Seite gehemmt, woraus höhere Acetylierungsgrade für Tubulin als für Histone resultieren.<sup>4,13,18</sup> Durch diese Acetylierung kommt es zu einer Kondensation des Tubulins und damit zu einem Mitosestopp, wodurch Tumorzellen durch den Einsatz von selektiven HDAC6i in ihrem Wachstum unterdrückt werden.<sup>18</sup>



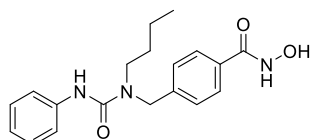
Tubacin (8)



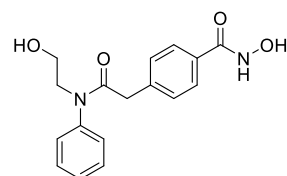
Ricolinostat (9)



Tubastatin A (10)



Nexturastat A (11)



HPOB (12)

**Abb. 1.6.** Eine Auswahl selektiver HDAC6i.

Von der bisher begrenzten Anzahl an selektiven HDAC6i sind die meisten aufgrund ihrer ZBG in die Gruppe der Hydroxamsäure-Derivate einzuordnen.<sup>22</sup>

Innerhalb dieser Gruppe lassen sich diese jedoch anhand ihres Linkers bzw. ihrer Kopfgruppe grob in zwei weitere Gruppen unterteilen: Inhibitoren mit einer sterisch anspruchsvollen und lipophilen Kopfgruppe und jene, die in ihrer Linker-Einheit eine Phenylfunktion besitzen.<sup>20</sup>

Während in die erst genannte Gruppe beispielsweise Tubacin (8) und Ricolinostat (9) einzuordnen sind, gehören Nexturastat A (11) und HPOB (12, *N*-Hydroxy-4-((2-hydroxyethyl)(phenyl)amino)-2oxoethyl)benzamid zur Letzteren.<sup>20</sup>

#### 1.3.4.2.1 Tubacin (8)

Tubacin (8) war der erste selektive HDAC6i, der spezifisch die Deacetylierung von  $\alpha$ -Tubulin in Säugetierzellen hemmen konnte.<sup>13,22</sup> Die Identifizierung dieses Inhibitors erfolgte durch ein Screening von 7392 Verbindungen und anschließende *in vitro*-Zellassays.<sup>22</sup> Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Tubacin (8) die Zellmotilität erniedrigt, jedoch keinen Einfluss auf die Stabilität vom Mikrotubulus sowie auf den Zellzyklus ausübt.<sup>13</sup> Tubacin (8) findet keine Anwendung in der klinischen Forschung, sondern dient lediglich zur Untersuchung von Struktur-Wirkungsbeziehungen (s. Kap. 2).<sup>31</sup>

#### 1.3.4.2.2 Ricolinostat (9)

Ricolinostat (9, ACY 1215) ist der erste Isoform-selektive HDAC6i, der sich in Kombination mit Bortezomib in der Phase II der klinischen Studie für die Behandlung des multiplen Myeloms befindet.<sup>20,46</sup> Mit dieser Kombination aus einem Proteasom-Inhibitor (Bortezomib) und einem HDAC6i soll einerseits bei wiederkehrendem Multiplen Myelom die Resistenz gegenüber der alleinigen Gabe von Bortezomib überwunden werden und andererseits der synergistische Effekt genutzt werden.<sup>20</sup> Der synergistische Effekt ist darin begründet, dass es durch den Proteasom-Inhibitor zu einer Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen kommt, die wiederum durch die Hemmung von HDAC6 nicht über den Aggresom-Signalweg abgebaut werden können, woraufhin es zur Induktion von Apoptose kommt.<sup>46</sup>

#### 1.3.4.2.3 Tubastatin A (10)

Im Jahr 2010 wurde Tubastatin A (10) anhand eines Struktur-basierten Wirkstoffdesigns von Butler *et al.*<sup>47</sup> entwickelt. Es dient heute häufig - wie auch in dieser Arbeit - als Leitstruktur für die Evaluierung von neuen selektiven HDAC6i.<sup>17</sup> Mit Tubastatin A (10) konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von selektiven HDAC6i auch im Bereich von neurodegenerativen und chronisch-inflammatorischen Erkrankungen möglich ist.<sup>17</sup> Dies wird einerseits durch *in vitro*-Untersuchungen gestützt, die belegen, dass Tubastatin A (10) eine konzentrationsabhängige neuroprotektive Wirkung gegen - durch Glutathion-induzierten - oxidativen Stress aufweist.<sup>17</sup> Andererseits konnten Lee *et al.*, im *in vivo*-Arthritis-Mausmodell zeigen, dass Tubastatin A (10) zu einer signifikanten Verbesserung der Synovialentzündung beiträgt, und sich protektiv auf die Gelenkdestruktion auswirkt.<sup>48</sup>

#### 1.3.4.2.4 Nexturastat A (11)

Nexturastat A (11) weist im Vergleich zu Tubastatin A (10) ein verbessertes inhibitorisches Profil auf sowie eine sehr ausgeprägte Selektivität gegenüber anderen Isoenzymen (600-fach größer gegenüber HDAC1 und 190-fach größer gegenüber HDAC8).<sup>20</sup>

#### 1.3.4.2.5 HPOB (12)

Der von Lee *et al.* entwickelte selektive HDAC6i HPOB (12) hemmt die katalytische Aktivität von HDAC6 *in vitro* und *in vivo*. Daraus resultiert eine Hyperacetylierung von  $\alpha$ -Tubulin und Prx, wohingegen der Acetylierungsgrad der Histone (Substrate der HDAC

Klasse I) unverändert bleibt.<sup>27</sup> HPOB (**12**) bewirkt eine Wachstumshemmung, induziert jedoch weder in gesunden noch in transformierten Zellen den Zelltod.<sup>27</sup> Dieser selektive HDAC6i hat das therapeutische Potenzial, in einer Kombinationstherapie die Wirkung von Zytostatika zu verstärken.<sup>27</sup>

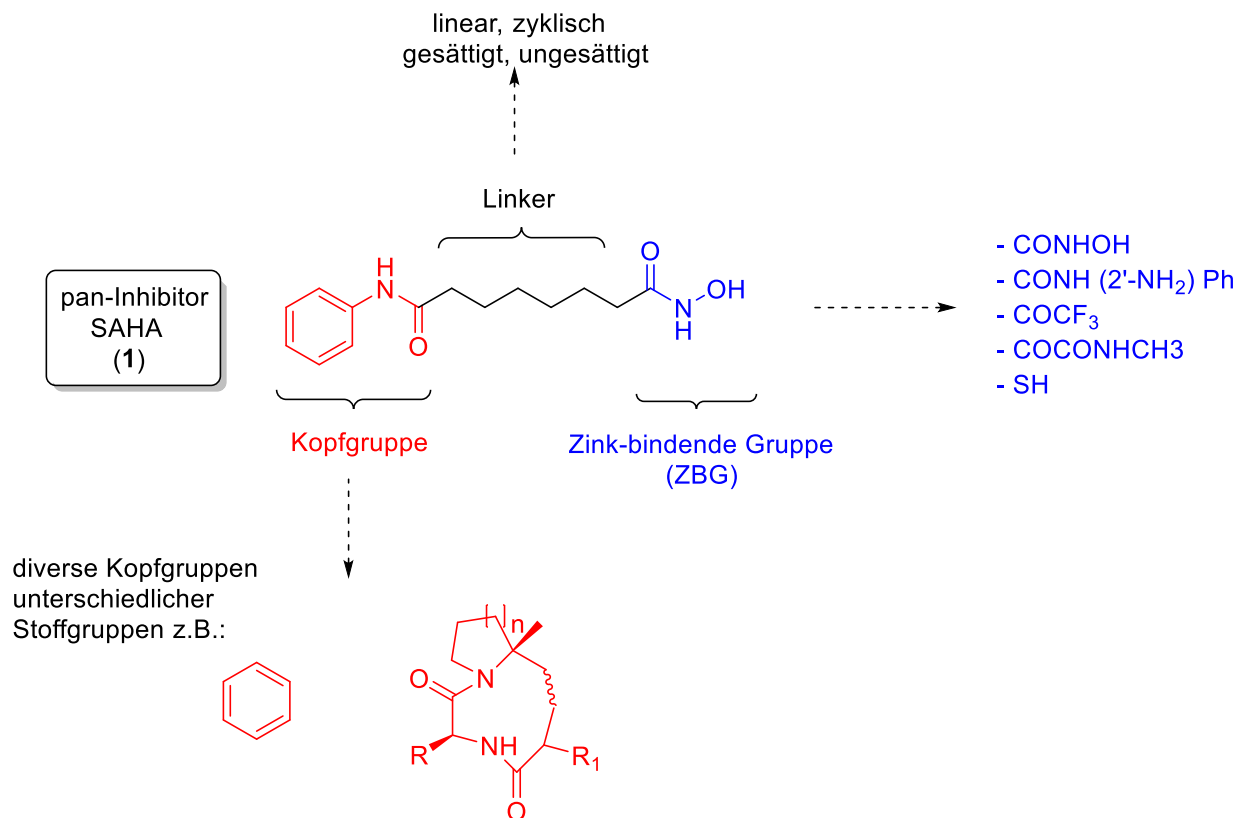
## **Kapitel 2**

### **Aufgabenstellung**

## 2 Aufgabenstellung

In den letzten Jahren hat die Entwicklung von HDACi immer mehr an Bedeutung gewonnen, nachdem bei einer Vielzahl an Erkrankungen ein Zusammenhang zwischen epigenetischen Veränderungen und der Krankheitsentstehung festgestellt werden konnte (s. Kap. 1.3.3).<sup>49</sup> Während die erste Generation der HDACi alle Zink-abhängigen HDAC-Klassen hemmt (pan-HDACi) und somit ein ausgeprägtes Nebenwirkungsprofil aufweist, (s. Kap. 1.3.4.1.2) wurde der Fokus dieser Arbeit auf die Synthese von Isoform-selektiven HDACi gelegt.<sup>50</sup> Dabei wurde der Schwerpunkt auf die Isoform HDAC6 gelegt, da sich einerseits herausgestellt hat, dass diese in vielen verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt ist und andererseits eine Hemmung dieser Isoform die Viabilität der Zelle nicht beeinträchtigt (s. Kap. 1.3.4.2).<sup>22,51</sup> Bevor jedoch mit der Synthese begonnen werden konnte, wurde zunächst nach einer geeigneten Leitverbindung gesucht, die die Anforderungen des allgemeingültigen HDACi-Pharmakophors repräsentiert (s. **Abb. 2.1**). Dadurch konnte evaluiert werden, welche wesentlichen Bestandteile im Molekül vorhanden sein müssen, um einen selektiven und potenten HDAC6i zu synthetisieren.

## 2.1 Struktureller Aufbau von HDAC-Inhibitoren



**Abb. 2.1.** Schematische Darstellung des gemeinsamen Pharmakophors der HDACi unter Berücksichtigung der für die einzelnen Untereinheiten typischen Vertreter.<sup>52</sup>

Die Struktur der HDACi ist grundsätzlich durch eine ZBG, eine Kopfgruppe und einen Linker, welcher die beiden erstgenannten verbindet, charakterisiert.<sup>49</sup>

Die ZBG chelatisiert das zentrale Zinkion des Enzyms und nimmt somit eine wesentliche Rolle in der inhibitorischen Aktivität der HDACi ein.<sup>13,49</sup> Zu den präferierten ZBG gehören die Hydroxamsäure und das Benzamid (für HDAC Klasse I selektiv), während Thiole und Carbonsäuren eher eine untergeordnete Rolle spielen, da sie im Allgemeinen eine schwächere Aktivität im zellulären System aufweisen.<sup>13,49</sup> Als weitere Vorteile dieser ZBG sind die relativ einfache Handhabung in der Synthese sowie eine gute *in vitro*-Stabilität zu nennen.<sup>49</sup> Im Gegensatz dazu weisen jedoch Verbindungen mit dieser ZBG schlechte pharmakokinetische Eigenschaften (schneller Zerfall und Clearance *in vivo*) sowie unerwünschte Nebenwirkungen auf.<sup>49</sup> Diese Nebenwirkungen kommen dadurch zustande, dass die Hydroxamsäuren auch andere Zink-abhängige Enzyme, wie Aminopeptidasen, Matrix-Metalloproteasen und



Carboanhydrasen komplexieren können.<sup>17,49</sup> Somit kann die Verbesserung der Selektivität der HDACi eher über Veränderungen betreffend die Kopfgruppe und den Linker erzielt werden.<sup>49</sup>

Butler *et al.*<sup>47</sup> und Di Micco *et al.*<sup>45</sup> stellten fest, dass die Größe des Linkers ein entscheidendes strukturelles Element darstellt, da dieser der Kopfgruppe des Inhibitors eine bestimmte Ausrichtung im hydrophoben Kanal des Enzyms gibt. Aufgrund der Tatsache, dass Isoformen der HDAC Klasse I, wie beispielsweise HDAC1, einen schmaleren Kanal aufweisen, könnte durch die Verwendung von voluminöseren Linkern die Isoform-Selektivität gesteigert werden.<sup>45,47</sup> Zudem können Interaktionen zwischen dem längeren Linker und den nicht-polaren Resten am Eingang des hydrophoben Kanals ermöglicht werden.<sup>13</sup>

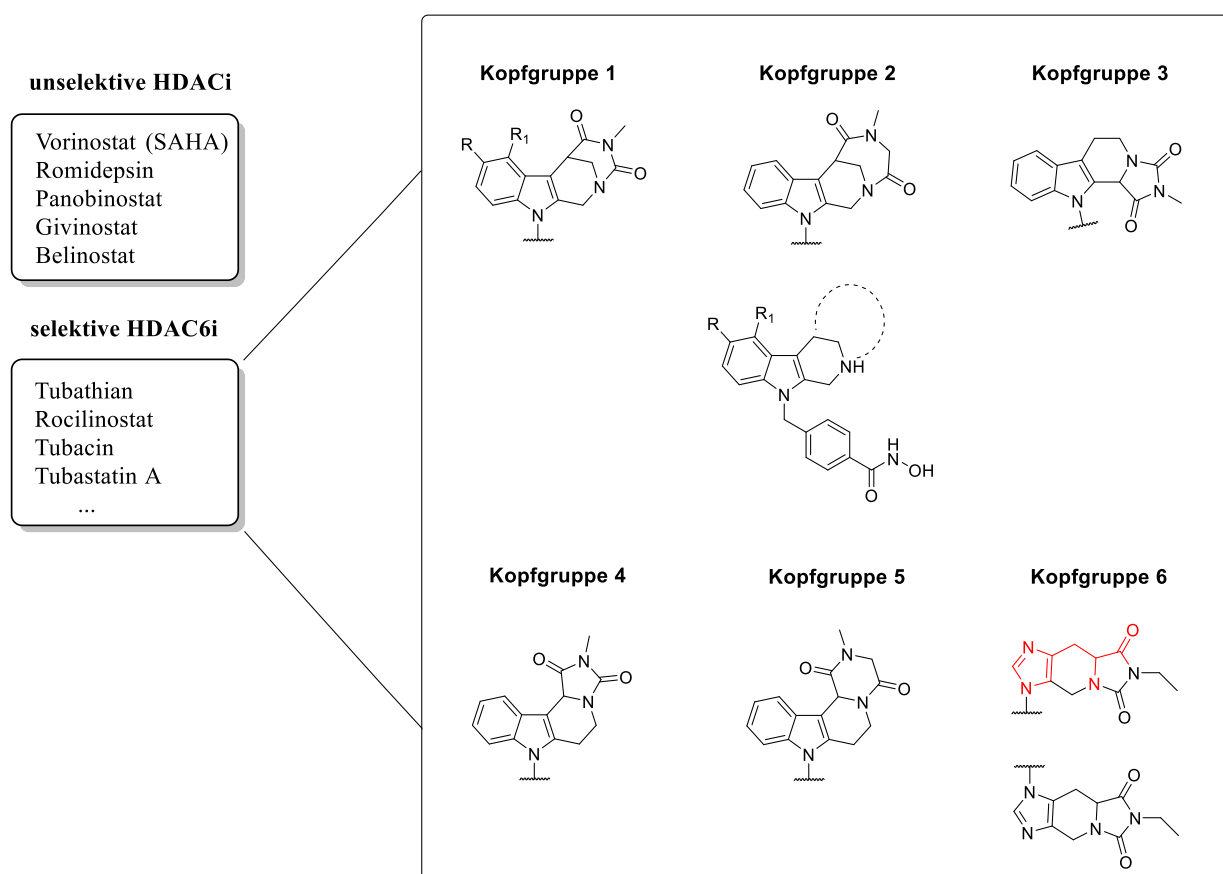
Des Weiteren konnte durch homologes Modelling festgestellt werden, dass HDAC6 die größte aktive Bindungstasche innerhalb der HDAC-Familie besitzt und demnach raumeinnehmende Kopfgruppen besser in diese Bindungstasche passen.<sup>53</sup> Aufgrund dieser Tatsache kann der Einbau sterisch anspruchsvoller Kopfgruppen zu einer Verbesserung der Interaktion zwischen dieser und den spezifischen Aminosäureresten innerhalb der Substratbindungsstelle beitragen.<sup>17</sup> Die Kopfgruppe stellt damit in Bezug auf die Steigerung der HDAC6-Selektivität den entscheidenden Faktor dar.<sup>20,54</sup>

Der erste selektive HDAC6i war Tubacin (**8**).<sup>55</sup> Dieser konnte sich jedoch aufgrund seiner strukturellen Nachteile in den *in vivo*-Untersuchungen nicht als Inhibitor durchsetzen.<sup>56</sup> Dabei wirken sich besonders seine ausgeprägte Lipophilie (ClogP = 6,36) und das hohe Molekulargewicht (721,86 g / mol) nachteilig aus.<sup>27,47</sup> Aufgrund dieser Tatsache wird das Tubacin (**8**) vorwiegend zu Forschungszwecken im Bereich der Struktur-Wirkungsbeziehung herangezogen, um die pharmakologischen Eigenschaften der nachfolgenden selektiven HDAC6i zu verbessern.<sup>27,31,56</sup>

Die Erkenntnisse über die Beschaffenheit der Kopfgruppe und der Austausch des Alkyl-Linkers durch eine kürzere, sterisch anspruchsvollere aromatische Untereinheit führten Butler *et al.* zur rationalen Synthese von Tubastatin A (**10**), einem hoch selektiven HDAC6i.<sup>20,48</sup>

## 2.2 Planung der Synthese

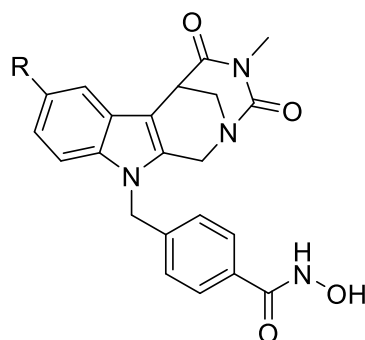
Basierend auf diesem für HDACi typischen Pharmakophor (hier anhand eines pan-Inhibitors gezeigt, s. **Abb. 2.1**) wurden Synthesevorschriften mit dem Ziel entwickelt hoch potente und selektive HDACi mit gesteigerter Bioverfügbarkeit und einem besseren Nebenwirkungsprofil zu synthetisieren. Dazu wurde der Tubastatin A (**10**)-Grundkörper modifiziert, um weitere Einblicke in die Struktur-Wirkungsbeziehungen zu erhalten. Die vorgenommenen Modifikationen basierten dabei nur auf der Kopfgruppe, während der Linker und die ZBG unverändert blieben, da diese im Rahmen der Dissertation von Dr. Leonhardt (Arbeitskreis Mahboobi, Universität Regensburg) bereits ausführlich untersucht wurden.



**Abb. 2.2.** Überblick über die geplanten Kopfgruppen-Modifikationen (Kopfgruppen 1-6) unter Beibehaltung von Linker und ZBG. Der rot hervorgehobene Part bei der Kopfgruppe 6 stellt den Histidingrundkörper innerhalb der Histidin-Substruktur dar.

Im Zuge dieser Arbeit wurde der Tetrahydro- $\gamma$ -carbolin-Grundkörper des Tubastatins (**10**) durch eine Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-Grundstruktur ausgetauscht und eine Hydantoin-Partialstruktur (D-Ring), als wesentlicher Bestandteil der Kopfgruppe 1, eingeführt. Diverse Derivatisierungen an dieser Kopfgruppe dienten der Überprüfung, ob eine

weitere Isoenzym-Selektivitätssteigerung möglich ist. Hervorzuheben ist an dieser Stelle die Verknüpfung der Kopfgruppe 1 mit dem 4-(2-morpholinethoxy)-Substituenten, welche der Löslichkeitsverbesserung und somit der Optimierung der Bioverfügbarkeit diene (s. **Abb. 2.3**).



**13a:** R = H

**13h:** R = 8-(2-morpholinethoxy)  
x HCl

**Abb. 2.3.** Darstellung der Leitverbindung Marbostat-100 (**13a**) und des wasserlöslichen Derivates **13h**.

Die Kopfgruppe 2 weist im Vergleich zur Kopfgruppe 1 eine um eine Methylengruppe erweiterte Hydantoin-Partialstruktur im D-Ring auf. Durch den Einbau einer zusätzlichen Methylengruppe in die Kopfgruppe wird die Hydantoin-Partialstruktur zur homologen Hydantoin-Partialstruktur erweitert. Mit Hilfe dieser Modifikation sollte herausgefunden werden, inwieweit der Hydantoin-ähnliche Aufbau des D-Ringes zur inhibitorischen Wirkung beiträgt.

Mittels der Synthese der Kopfgruppe 3 sollte untersucht werden, inwiefern die Ausrichtung des D-Ringes in einem tetrazyklischen Ringsystem die biologische Wirkung beeinflusst. Daher erfolgte eine anguläre Anellierung der Hydantoin-Partialstruktur an die Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-Grundstruktur.

Des Weiteren sollten die Synthesen der Kopfgruppe 4 und 5 durchgeführt werden, wobei der Unterschied der Kopfgruppe 4 zur Kopfgruppe 5 darin bestand, das Letztere einen um eine Methylengruppe erweiterten D-Ring aufweisen sollte. Diese beiden Kopfgruppen unterscheiden sich von den Kopfgruppen 1-3, indem in den Tetrahydro- $\gamma$ -carbolin-Grundkörper des Tubastatins (**10**) die Hydantoin-Partialstruktur in Form des D-Ringes anelliert wurde ( $\gamma$ -Marbostat-100). Dadurch sollte dieses tetrazyklische

Ringsystem mit dem des Tubastatin A (**10**) sowie dem Marbostat-100 (**13a**) in seiner Hemmwirkung verglichen werden.

Ob der Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-Grundkörper essentiell für die sehr gute Wirkung der Leitverbindung Marbostat-100 (**13a**) ist, wurde durch den Ersatz des genannten Grundkörpers mit einer Histidin-Substruktur (Kopfgruppe 6) überprüft.

Die Verbindung **13a** wurde durch ihre sehr guten pharmakologischen Testergebnisse (vgl. Kap. 4.2.1 und 5.2) im Vergleich zu den anderen vorgenommen Derivatisierungen an der Kopfgruppe (Kopfgruppe 2-6) als Leitverbindung im Arbeitskreis Mahboobi etabliert. Aus diesem Grund wurde der weitere Fokus auf die Kopfgruppe 1 gelegt. Dabei stand die Frage im Vordergrund welchen Einfluss die Stereochemie auf die biologische Aktivität hat. Die im Rahmen der Derivatisierung der Kopfgruppe 1 entstandene racemische Verbindung **13h** wies im Vergleich zur Leitverbindung **13a** ein verbessertes Löslichkeitsverhalten auf, weswegen von dieser ebenfalls beide Enantiomere synthetisiert wurden.

Zunächst sollte nach erfolgreicher Synthese die Hemmwirkung der Substanzen am isolierten Target (rekombinantes Enzym) evaluiert werden (s. Kap. 4), bevor die biologische Wirkung im zellulären System untersucht wurde (s. Kap. 5). Im Anschluss daran sollte die Testung im *in vivo*-Mausmodell für die Verbindungen erfolgen, die sich im Rahmen der *in vitro*-Voruntersuchungen als geeignet herausstellten. Als wirksam gelten Verbindungen, die im Vergleich zu etablierten Referenzsubstanzen eine hohe Isoenzym-Selektivität aufweisen, die mit einer ausgeprägten inhibitorischen Aktivität am Target (HDAC6-Enzym) verbunden ist. Im Fall der Verbindung **13h** wurde als weiteres Kriterium das verbesserte Löslichkeitsverhalten mitberücksichtigt. Sofern eine Verbindung die für eine *in vivo*-Untersuchung gesetzten Voraussetzungen erfüllte, wurde diese einer vorhergehenden Metabolisierungsstudie unterzogen, um Anhaltspunkte über das pharmakokinetische Profil zu erhalten.

# Kapitel 3

## Chemischer Teil



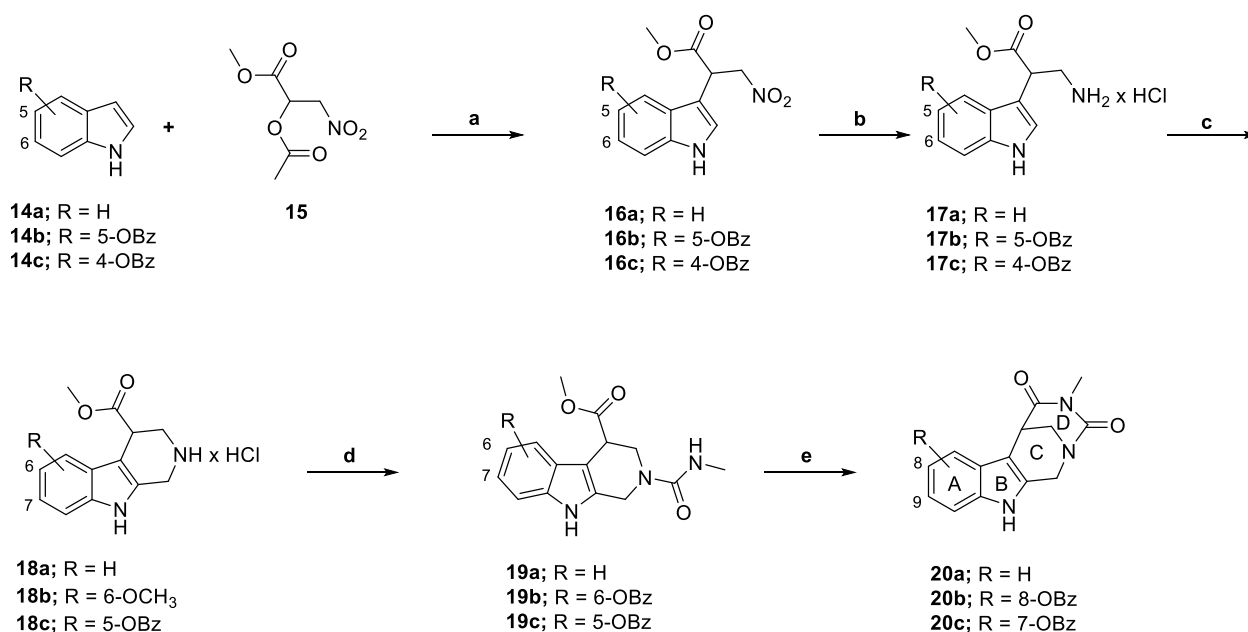
### 3 Chemischer Teil

Aufgrund der im Kap. 1.3.4.2 beschriebenen Vorteile selektiver HDACi gegenüber pan-HDACis sowie der besonderen Rolle der Isoform HDAC6, lag der Schwerpunkt dieser Arbeit darauf, durch rationale Planung potente und selektive HDAC6i zu synthetisieren. Dabei sollte, wie zuvor erläutert, das Tubastatin A (**10**) als Orientierung dienen, wobei die trizyklische Kopfgruppe um ein weiteres Ringsystem erweitert und die Tetrahydro- $\gamma$ -carbolin-Grundstruktur durch eine Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-Struktur ausgetauscht wurde.

Die in diesem Kapitel präsentierten Verbindungen wurden nach erfolgreicher Synthese und biologischer Testung patentiert: „Preparation of fused heterocyclic compounds as HDAC6 inhibitors and their uses“ (Patentnummer: WO2016020369A1).

Zudem wurden einige Verbindungen im Rahmen der Publikation „Marbostat-100 Defines a New Class of Potent and Selective Antiinflammatory and Antirheumatic Histone Deacetylase 6 Inhibitors“<sup>57</sup> bereits publiziert.

#### 3.1 Synthese der Inhibitoren mit Kopfgruppe 1



**Abb. 3.1.** Synthese der Kopfgruppe 1. Reagenzien und Bedingungen: (a) Indol (**14a-14c**), Methyl 2-acetoxy-3-nitropropanoat (**15**, 1,2 eq), Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (basisch, 1,2 eq), 65 °C, 1,5 Std; (b) MeOH, THF, Zn (2 eq), 36 % HCl<sub>(aq)</sub>; (c) (1) MeOH, 36 % Formaldehyd<sub>(aq)</sub> (1,2 eq), 60 °C, 1 Std; (2) RT., 16 Std; (d) MeCN, DIPEA (3,5 eq), 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-methyl-carbammat (1,1 eq), RT., 16 Std; (e) Dioxan, Cs<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (1,2 eq), 110 °C, 2 Std.

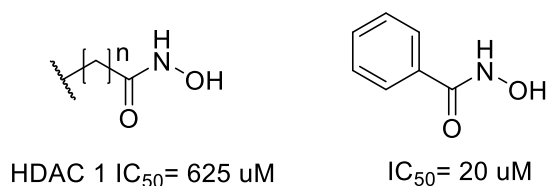
Zur Synthese des im Rahmen dieser Dissertation zentralen Intermediates **16a** für Derivate mit Kopfgruppen 1 und 2, wurde zunächst das Methyl 2-acetoxy-3-nitropropanoat (**15**) entsprechend Lit.<sup>58</sup> synthetisiert. Die entsprechenden Indole **14a-c** wurden in der Folge unter Katalyse von basischem Aluminiumoxid ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) mit **15** umgesetzt.<sup>58</sup>  $\text{Al}_2\text{O}_3$  katalysiert die elektrophile aromatische Substitution ( $\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$ -Reaktion) von **15** an die 3-Position der elektronenreichen Indole und lieferte die 2-(1*H*-indol-3-yl)-3-nitropropanoate **16a-c**. Die Reduktion der Nitrogruppe der Verbindungen **16a-c** mit Zink /  $\text{HCl}_{(\text{aq})}$  und alkalische Aufarbeitung ergaben die primären Amine **17a-c**, welche in der Folge zur Reinigung als Hydrochlorid gefällt wurden.<sup>59</sup>

Zur Darstellung des Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-Grundgerüsts wurde die Pictet-Spengler-Reaktion durchgeführt. Diese ist von großer Bedeutung, da sie sowohl für die Wirkstoff- und Alkaloidsynthese in Laboratorien genutzt wird, als auch von verschiedenen Organismen, um Tetrahydro- $\beta$ -carboline oder Tetrahydroisoquinoline zu synthetisieren.<sup>60</sup> Die von Bischler und Napieralski verwendete Reaktion zur Kondensation von  $\beta$ -Arylethylaminen mit organischen Säuren führte zunächst zu ungesättigten Kondensationsprodukten (Pyridinkernen), die in weiterer Folge einer Hydrierung unterzogen werden mussten.<sup>61</sup> Um sich diesen zusätzlichen Schritt zu ersparen, modifizierten Pictet und Spengler die Bischler-Napieralski Synthese, indem sie die Säure durch den entsprechenden Aldehyd ersetzten.<sup>61</sup> Analog dazu wurden die Hydrochloride **17a-c** mit Formaldehyd zu Methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat Hydrochloriden **18a-c** umgesetzt, wobei die Cyclisierung unter Wasserabspaltung erfolgte.<sup>62</sup> Die Struktur des sechsgliedrigen D-Ringes wurde in zwei Reaktionsschritten aufgebaut. Zunächst wurden **18a-c** in Acetonitril suspendiert und durch die Zugabe von Diisopropylethylamin (DIPEA) *in situ* die Base des Hydrochlorids freigesetzt. Anschließend erfolgte die Einführung der Harnstoff-Substruktur mittels 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-methylcarbammat, wodurch **19a-c** erhalten wurden.<sup>17</sup> Hierbei wurde zur Bildung der Harnstoff-Partialstruktur das hoch toxische Methylisocyanat<sup>63</sup> durch 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-methyl-carbammat substituiert.<sup>64</sup> Dieser Austausch führte zu keinen Komplikationen bei der Reinigung des Produktes, da alle entstandenen Nebenprodukte eine gute Wasserlöslichkeit aufweisen und somit mittels Extraktion entfernt werden konnten.<sup>64</sup> Der letzte Reaktionsschritt zum Aufbau des D-Ringes erfolgte unter Verwendung von Cäsiumcarbonat, welches als Base den nucleophilen Angriff des sekundären Harnstoff-Stickstoffs am Methylester begünstigt und damit zur Bildung von **20a-20c** führte.<sup>17,65</sup> Cäsiumcarbonat erwies sich dabei als die

geeigneter Base im Vergleich zu Kaliumcarbonat, da es die höhere Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln besitzt.<sup>66</sup>

Wie bereits im Kap. 2 beschrieben, sind die beiden Elemente - Kopfgruppe und Linker - des Pharmakophors entscheidend für die Entwicklung von selektiven HDACi.<sup>47</sup> Nachdem die ersten Modifikationen an der Kopfgruppe ausgehend von Tubastatin A (**10**) durchgeführt wurden, sollte ein Linker synthetisiert werden, der einen weiteren Beitrag zur Steigerung der Selektivität leistet. Typischerweise stellt der Linker ein hydrophobes Alkylketten-Gerüst dar, welche den hydrophoben katalytischen Kanal der HDAC ausfüllt.<sup>67</sup> Die Grundidee dahinter ist es, mit Hilfe des Linkers die Aminosäuren im katalytischen Kanal der Enzyme nachzuahmen, wie z.B. bei Vorinostat (**1**), bei dem der Linker die Lysin-Alkylkette nachahmen soll.<sup>67</sup> Rodrigues *et al.*<sup>20</sup> konnten jedoch anhand von Tubacin (**8**) belegen, dass die Selektivität, welche maßgeblich durch das Vorhandensein einer sterisch anspruchsvollen und lipophilen Kopfgruppe bestimmt wird, abnimmt, wenn ein aliphatischer Linker vorliegt.

Diese Feststellung deckt sich mit den von Witter *et al.*<sup>68</sup> zuvor gemachten Untersuchungen. Diese konnten anhand von HDAC1 bestätigen, dass eine 30-fache Steigerung der inhibitorischen Aktivität erzielt werden kann, wenn die Aceto-Hydroxamsäure-Funktion durch eine Benzoyl-Hydroxamsäure-Funktion im Bereich des Linkers ausgetauscht wird (s. **Abb. 3.2**).<sup>68</sup>



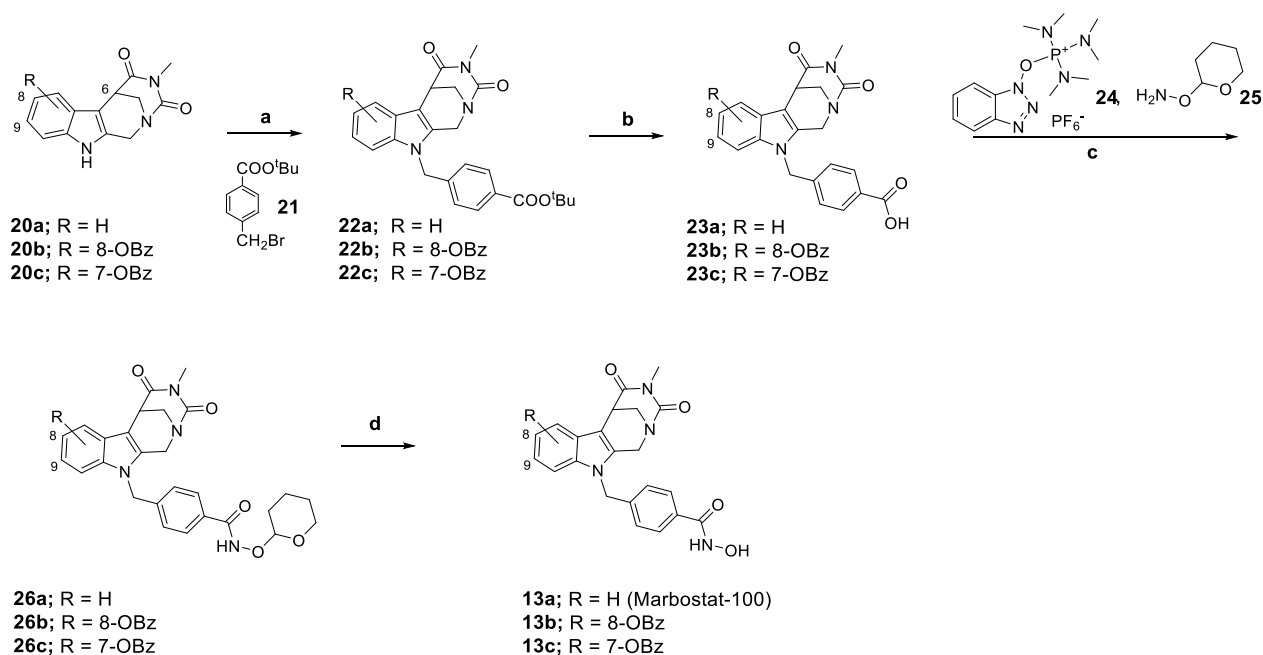
**Abb. 3.2.** Vergleich der inhibitorischen Aktivität eines Alkyl- vs. Aryl-Linkers anhand von HDAC1 in Anlehnung an Lit..<sup>68</sup>

Diese Verbesserung der inhibitorischen Effektivität durch das Einfügen eines substituierten Phenyl- bzw. Benzylrestes als Linker-Sequenz konnte drei Jahre später auch von Butler *et al.* für die Isoform HDAC6 beobachtet werden. Eine weitere Erhöhung der Selektivität für HDAC6 konnte zudem über die voluminöse Kopfgruppe erzielt werden.<sup>47</sup> Aus diesem Grund wurde diese Linker-Einheit auch bei den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Derivaten beibehalten. Die Einführung des Benzyl-Spacers, welcher seinerseits die chelatisierende Hydroxamsäure-Funktion aufweist, wurde in vier Reaktionsschritten durchgeführt:



Zunächst erfolgte die Alkylierung am Indol-Stickstoff nach Deprotonierung mittels NaH.<sup>69,70</sup> Die anschließende nucleophile Substitution am *tert*-Butyl 4-(brommethyl)benzoat (**21**) resultiert in der Bildung der Verbindungen **22a-c**.<sup>17,71</sup> Zur Sicherung der Struktur dieser Intermediate wurden diese mittels 2D-Spektroskopie verifiziert (s. Kap. 9.4.1 und Kap. 3.6.2).

Nach Alkylierung erfolgte die säurekatalysierte Spaltung der *tert*-Butoxycarbonyl-Gruppe, um die entsprechenden Carbonsäuren **23a-c** freizusetzen.<sup>72</sup> Diese wurden in der Folge zunächst mit Triethylamin (Et<sub>3</sub>N) deprotoniert, bevor eine durch Benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)-posphonium hexafluorophosphat (BOP, **24**) katalysierte Amidierung mit *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-hydroxylamin (NH<sub>2</sub>OTHP, **25**) durchgeführt wurde.<sup>57,73,74</sup> Diese lieferte die als Acetal geschützten Hydroxamsäuren **26a-c**, die im finalen Schritt durch saure Hydrolyse (0,6 N Salzsäure<sub>(aq)</sub>) zu den entsprechenden Hydroxamsäuren **13a-c** gespalten wurden.<sup>57</sup> Der Zwischenschritt über die Acetalbildung bringt den Vorteil der leichteren Handhabbarkeit mit sich, da weder die Carbonsäuren **23a-c** noch die Hydroxamsäuren **13a-c** eine chromatographische Reinigung zulassen. Die Gewinnung der Endverbindungen als kristalline Produkte erfolgte durch die im Kap. 9.4.1 beschriebenen Kristallisationsvorgänge.



**Abb. 3.3.** Synthese der HDACi mit Kopfgruppe 1. Reagenzien und Bedingungen: (a) (1) **20a** o. **20b** o. **20c**, DMF, Ar, NaH (1,1 eq), 0 °C, 15 min; (2) *tert*-Butyl 4-(bromomethyl)benzoat (**21**, 1,2 eq), RT., 1 Std; (b) TFA, RT., 15 min; (c) DMF, BOP (**24**, 1,2 eq), NH<sub>2</sub>OTHP (**25**, 4 eq), Et<sub>3</sub>N (3 eq), RT., 2-3 Std; (d) MeOH, 0,6 N HCl<sub>(aq)</sub>, RT., 30 min

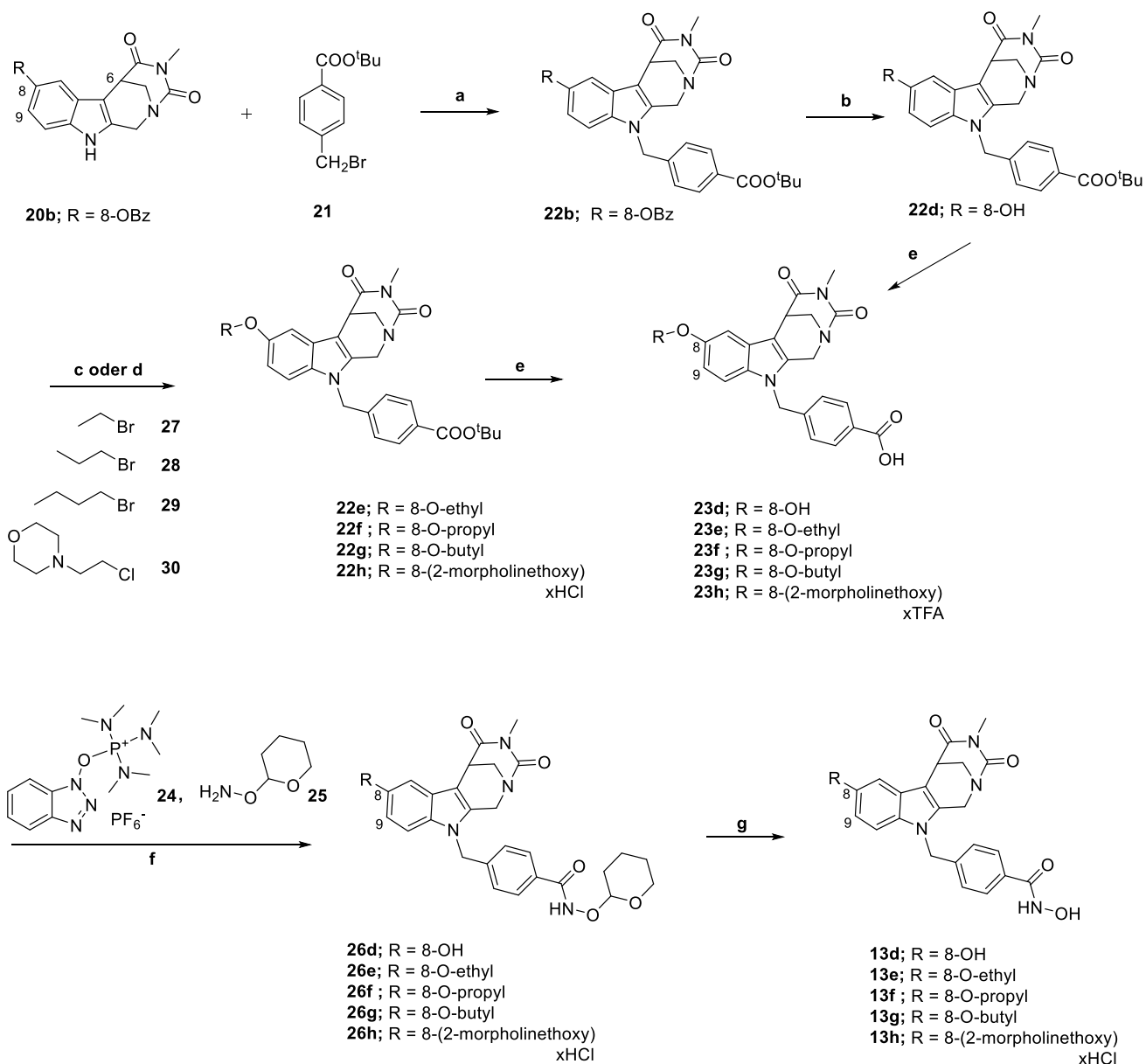
Im Rahmen der pharmakologischen Testung erwies sich die Substanz **13a**, die auch Bestandteil der Publikation von Sellmer *et al.*<sup>57</sup> ist und dort als Marbostat-100 (**13a**) bezeichnet wird, als ein potenter Inhibitor mit ausgeprägter selektiver HDAC6-Hemmung (s. Kap. 4.2.1 und Kap. 5.2.10)

Um zusätzliche Informationen über die Struktur-Wirkungs-Beziehungen in Bezug auf die biologische Aktivität der Kopfgruppe 1 gewinnen zu können, wurden weitere Derivate synthetisiert, welche am aromatischen System der Indol-Partialstruktur substituiert sind.

Die gewonnenen Erkenntnisse aus den Untersuchungen am isolierten Target-Enzym zu den beiden Derivaten **13b** und **13c** belegen, dass die Substitution an Position 8 vergleichbare K<sub>i</sub>-Werte wie die an Position 7 liefert.

Des Weiteren konnte bei der Struktur-Wirkungsstudie im Rahmen der Dissertation von Dr. Leonhardt, welcher seinerseits ebenfalls Modifikationen an dieser Kopfgruppe vorgenommen hatte, gezeigt werden, dass Substitutionen an der Position 8 im Vergleich zur Position 9 Inhibitoren mit besserer Aktivität lieferten. Da sich zudem Derivatisierungen an der

C8-Position deutlich kostengünstiger realisieren ließen, wurden die weiteren Derivatisierungen dieser Kopfgruppe an der C8-Position vorgenommen.



**Abb. 3.4.** Synthese der Derivate mit Kopfgruppe 1. Reagenzien und Bedingungen: (a) (1) **20b**, DMF, Ar, NaH (1,1 eq), 0 °C, 15 min; (2) *tert*-Butyl 4-(brommethyl)benzoat (**21**, 1,2 eq), RT., 1 Std; (b) THF, Pd / C, H<sub>2</sub>; (c) (1) für **22e-g**: **27**, **28**, **29**, DMF, NaH (1,1 eq), 0 °C, 15 min; (2) RT., 1 Std; (d) für **22h**: 2-Butanon, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 eq), 4-(2-Chloroethyl)morpholin hydrochlorid (**30**, 1,5 eq), Reflux, 4 Tage; (e) TFA, RT., 15 min; (f) DMF, BOP (**24**, 1,2 eq), NH<sub>2</sub>OTHP (**25**, 4 eq), Et<sub>3</sub>N (3 eq), RT., 2-3 Std; (g) MeOH, 0,6 N HCl(aq), RT., 30 min-2 Std

Bei den in Position 8 alkylierten Marbostat-100-Derivaten wurden zunächst die Endverbindungen **13d-g** synthetisiert, um die Auswirkungen, die diese Substituenten auf die inhibitorische Wirkung haben, zu untersuchen.

Nachdem die *in vitro*-Untersuchungen ergeben hatten, dass die Substitution in der Position 8 zu keiner Beeinträchtigung der inhibitorischen Aktivität führte, wurde die Synthese der

Verbindung **13h**, wie in **Abb. 3.4** dargestellt, durchgeführt. Dieser basische Substituent liefert pharmazeutisch verwendbare Salze, die eine verbesserte Löslichkeit bei gleichbleibender Stabilität aufweisen.<sup>75</sup> Durch die Einführung des Morpholin-Restes in die Grundstruktur der Leitverbindung Marbostat-100 (**13a**) konnte dies, wie schon in der Literatur<sup>75,76</sup> für andere Verbindungen gezeigt, erreicht werden (s. Kap. 5.2.3).

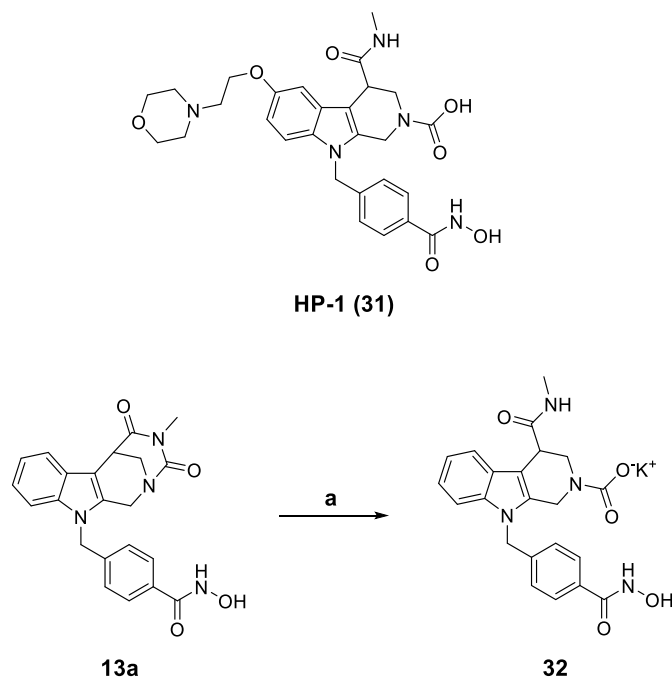
Zur Synthese der in Position 8 alkylierten Marbostat-100-Derivaten wurde zunächst die Kopfgruppe, wie für **20b** beschrieben, aufgebaut. Ausgehend von **20b** erfolgte die Einführung des Benzyl-Spacers analog zur Darstellung von **22b** (s. **Abb. 3.3**, Reaktion a). Anschließend wird katalytisch mit Pd / C (10 %) und H<sub>2</sub> debenzyliert, wodurch **22d** entsteht.<sup>57</sup> Die folgende Kopplung, die zur Bildung von **22e-g** führte, erfolgte in Anlehnung an die Lit.<sup>69,70</sup> und in Analogie zur bereits beschriebenen Alkylierung von *tert*-Butyl 4-(brommethyl)benzoat. Für die Alkylierung von **22d** mit 4-(2-Chloroethyl)morpholin hydrochlorid **30** zu **22h** wurde die Kombination aus NaH in DMF durch das schonendere Verfahren mit Kaliumcarbonat in 2-Butanon ersetzt.<sup>69,77,78</sup> Aufgrund der geringeren Reaktivität von K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> musste bei dieser Methode mit deutlich längeren Reaktionszeiten (4 Tage) gerechnet werden, die sich jedoch positiv auf die Ausbeute auswirkten, da weniger Nebenprodukte entstanden.

Die säurekatalysierte Esterspaltung zu den Carbonsäuren **23d-g** erfolgte analog zu der Darstellung von **23a** (s. **Abb. 3.3**, Reaktion b). Im Fall von **23h** wurde das Trifluoessigsäure-Salz der Amino-Carbonsäure, verifiziert durch <sup>1</sup>F-NMR, erhalten. Die Einführung der Zink-chelatisierenden Hydroxamsäuren über die Bildung der Acetal-Schutzgruppe führte zu **13d-h** und wurde, wie in **Abb. 3.4** (Reaktionen c-d) illustriert, durchgeführt.

## 3.2 Synthese des Hydrolyseprodukt-Analogons aus der Metabolisierungsstudie

Die Verbindung **13h** wurde im Hinblick auf eine *in vivo*-Studie einer Metabolisierungsstudie unterzogen (s. Kap. 6.3.5). Dabei entstand durch Hydrolyse im Testsystem Hydrolyseprodukt (HP-1) **31**, welches synthetisch dargestellt werden sollte, um die inhibitorische Aktivität gegenüber HDAC6 *in vitro* zu testen. Stellvertretend wurde diese Synthese ausgehend vom Marbostat-100-Grundkörper durchgeführt, da von dieser Leitverbindung **13a** umfangreichere Struktur-Wirkungsbeziehungen vorlagen. Ausgehend von **13a** konnte selektiv mit 1,5 eq

Kaliumhydroxid die Hydantoin-Partialstruktur (vgl. Kap. 3.3) geöffnet werden ohne Beeinträchtigung des restlichen Heterozyklus (s. **Abb. 3.5**).

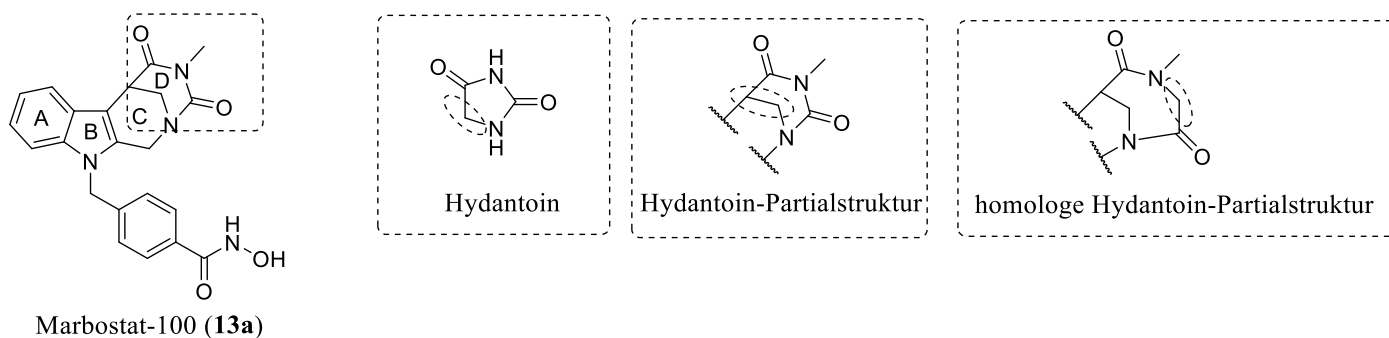


**Abb. 3.5.** Synthese von **32** als stellvertretende Testverbindung für HP-1 für pharmakologische Untersuchungen. Reagenzien und Bedingungen: (a) THF / MeOH (1:1), KOH (1,5 eq), RT, 2 Tage.

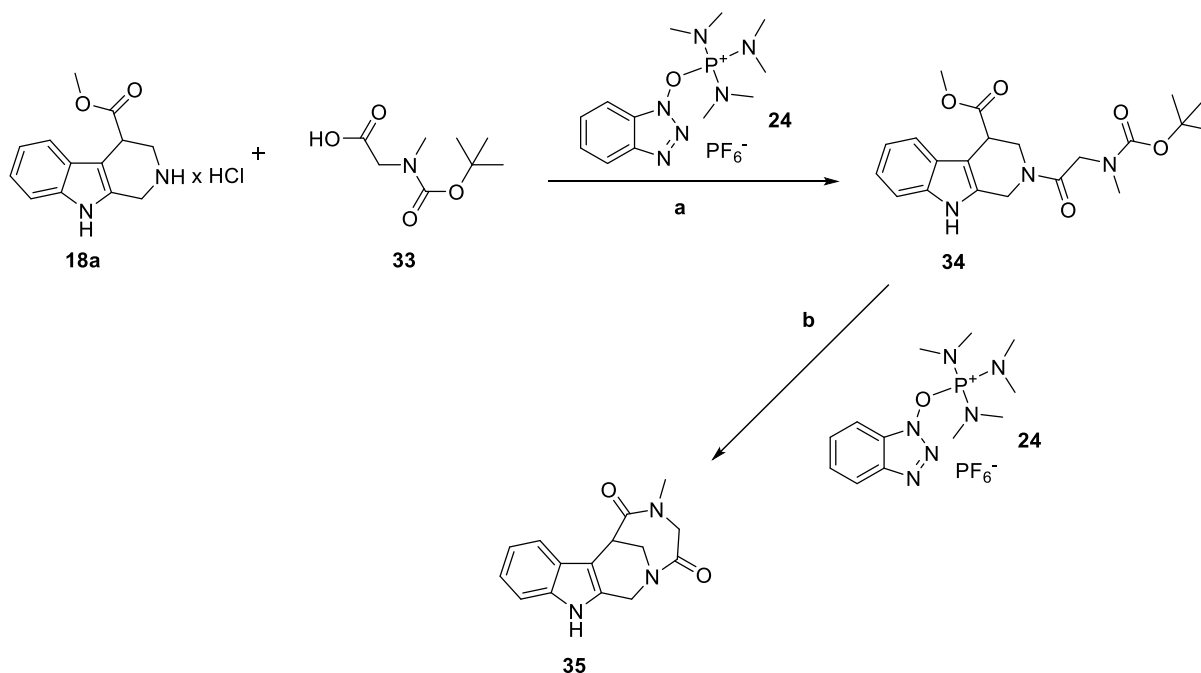
### 3.3 Synthese des Inhibitors mit Kopfgruppe 2

Im weiteren Rahmen der Untersuchung zu neuen Kopfgruppen für potente und selektive HDAC6i sollte evaluiert werden, inwieweit der Hydantoin-ähnliche Aufbau des D-Ringes zur inhibitorischen Wirkung beiträgt (vgl. Kap. 2).

Zur Erläuterung der im nachfolgenden verwendeten Bezeichnungen werden in **Abb. 3.6** die Hydantoin-Struktur, Hydantoin-Partialstruktur und homologe Hydantoin-Partialstruktur schematisch dargestellt.



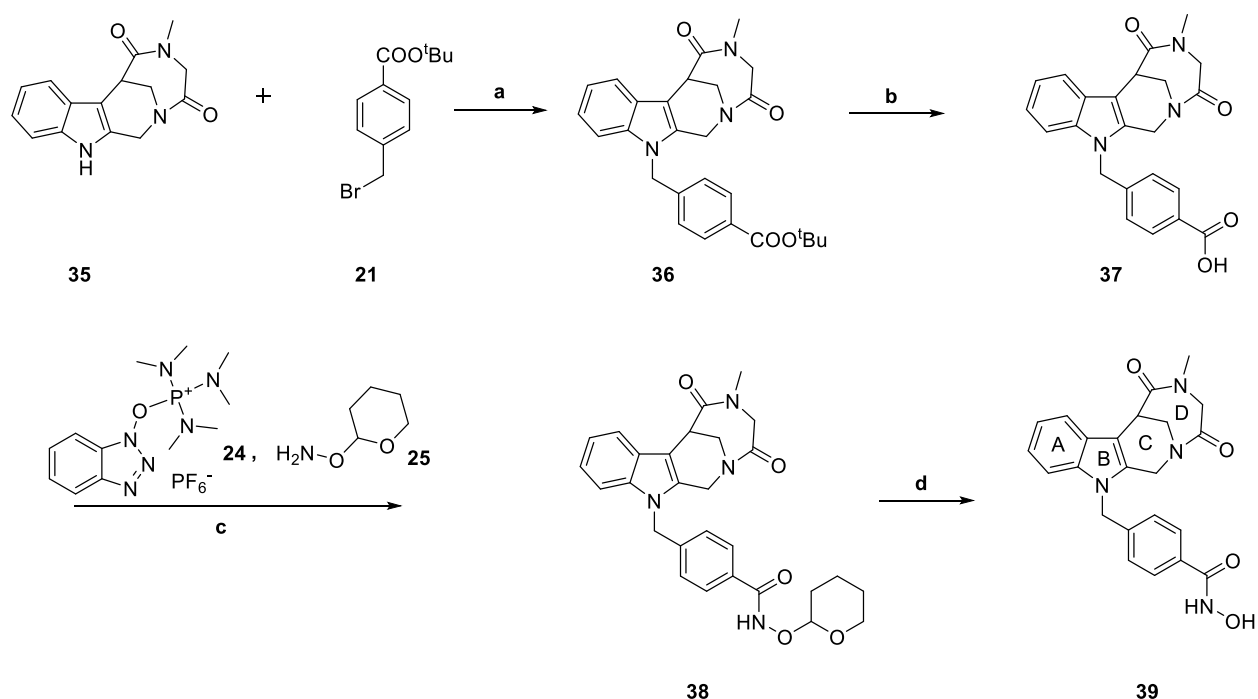
**Abb. 3.6.** Schematische Darstellung der verschiedenen Modifikationen in Bezug auf den D-Ring.



**Abb. 3.7.** Synthese der Kopfgruppe 2. Reagenzien und Bedingungen: (a) MeCN, Triethylamin, RT., 16 Std; (b) (1) H<sub>2</sub>O, THF, MeOH, LiOH, 60 °C, 2 Std; (2) 5-6 N HCl<sub>(iprop)</sub>, RT., 3 Std; (3) (1) DMF, MeCN, Triethylamin, RT., 24 Std; (2) 1 N HCl<sub>(aq)</sub>.

Im ersten Schritt zum Aufbau des 7-gliedrigen D-Ringes wurde ausgehend von **18a** die Carboxylgruppe von **33**, welches kommerziell verfügbar ist, durch BOP (**24**) aktiviert und die Amidierungsreaktion mit dem sekundären Amin **18a** zu **34** unter basischen Bedingungen (Triethylamin) durchgeführt.<sup>79</sup>

Die basische Katalyse des Cäsiumcarbonates, die zum intramolekularen Angriff des Harnstoff-Stickstoffs bei der Kopfgruppe 1 führte, konnte beim Aufbau des D-Ringes für die Darstellung der Kopfgruppe 2 nicht verwendet werden. Aus diesem Grund wurde zunächst die Verseifung von **34** mit Lithiumhydroxid vorgenommen, bevor die säurelabile *tert*-Butoxycarbonyl (Boc)-Schutzgruppe mit 5-6 N isopropanolischer Salzsäure gespalten werden konnte. Die Aktivierung der freien Carbonsäure mit BOP (**24**), sowie die basische Katalyse durch Triethylamin ermöglichten den intramolekularen Ringschluss unter Bildung des D-Ringes von **35**.<sup>79</sup>

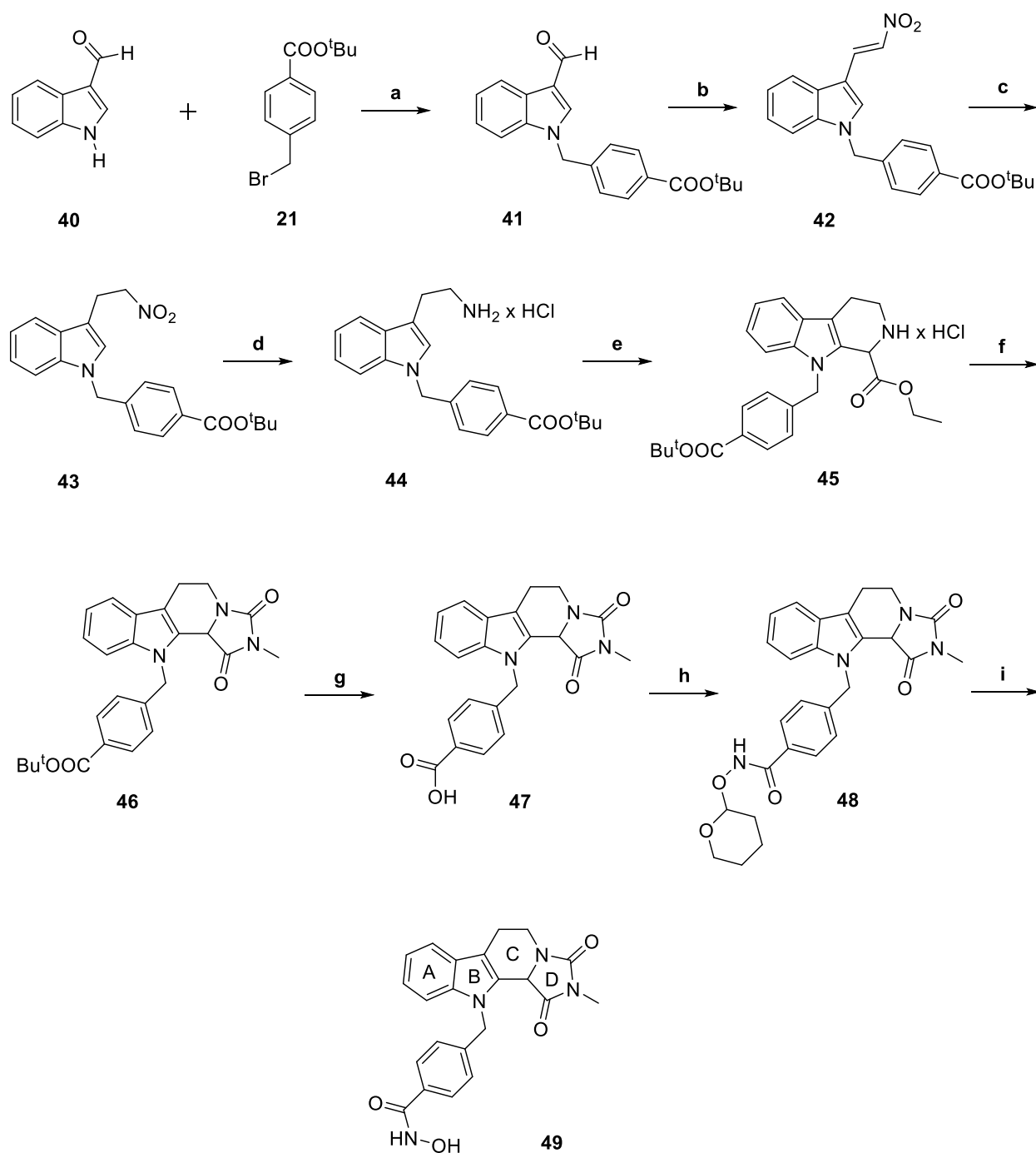


**Abb. 3.8.** Synthese des HDACi **39** mit homologer Hydantoin-Partialstruktur. Reagenzien und Bedingungen: (a) (1) **35**, DMF, Ar, NaH (1,1 eq), 0 °C, 15 min; (2) *tert*-Butyl 4-(bromomethyl)benzoat (**21**, 1,2 eq), RT., 1 Std; (b) TFA, RT., 15 min; (c) DMF, BOP (**24**, 1,2 eq), NH<sub>2</sub>OTHP (**25**, 4 eq), Et<sub>3</sub>N (3 eq), RT., 2-3 Std; (d) MeOH, 0,6 N HCl<sub>(aq)</sub>, RT., 30 min

Abschließend erfolgte die Einführung des Linkers (Benzyl-Spacer) von **36** durch Alkylierung mit **21**, katalysiert durch NaH in DMF. Die darauffolgenden Reaktionen, Spaltung der *tert*-Butyl-Schutzgruppe **37**, Amidierung mit NH<sub>2</sub>OTHP und die finale Spaltung der Acetal-Schutzgruppe zu der entsprechenden Hydroxamsäure **39** wurden, wie für Marbostat-100 (**13a**) erläutert (vgl. Kap. 3.1; **Abb. 3.3**, Reaktionen a-d), durchgeführt. **39** wird in weiterer Folge als Marbostat-2 bezeichnet.

### 3.4 Synthese des Inhibitors mit Kopfgruppe 3

Im weiteren Verlauf der Kopfgruppen-Entwicklung sollte evaluiert werden, inwiefern ein tetrazyklisches Ringsystem mit angularer Anellierung die inhibitorische Aktivität beeinflussen kann (vgl. Kap. 2). Dabei betraf die Modifikation lediglich den D-Ring, während der von der Leitverbindung Marbostat-100 (**13a**) bekannte Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-Gundkörper beibehalten wurde.



**Abb. 3.9.** Synthese des HDACi **49** mit Kopfgruppe 3. Reagenzien und Bedingungen: (a) DMF, NaH, *tert*-Butyl 4-(bromomethyl)benzoat (**21**, 1,2 eq); (b) NH<sub>4</sub>OAc, CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, Reflux, 10 Std; (c) CHCl<sub>3</sub>, *i*Prop., NaBH<sub>4</sub>, SiO<sub>2</sub>, RT., 24 Std; (d) (1) HOAc, Zn (1,1 eq), RT., 4 Std; (2) NH<sub>4</sub>OH; (3) THF, HCl; (e) MeOH, SiO<sub>2</sub>, Ethylglyoxalat, RT., 1 Std; (f) MeCN, DIPEA (3,5 eq), 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl methylcarbamate (1,1 eq), RT., 16 Std; (g) TFA, RT.; (h) DMF, BOP (**24**, 1,2 eq), NH<sub>2</sub>OTHP (**25**, 4 eq) Et<sub>3</sub>N (3 eq), RT, 2-3 Std; (i) MeOH, HCl(aq.), RT..

Der auch kommerziell erhältliche 1H-Indol-3-carbaldehyd (**40**) wurde durch Vilsmeier Formylierung<sup>80</sup> von Indol (**14a**) mittels Phosphoroxychlorid und DMF erhalten.<sup>81</sup> Der Aldehyd **40** wurde am Indol-Stickstoff nach Deprotonierung durch NaH mit **21** alkyliert und lieferte **41** (s. **Abb. 3.9**).



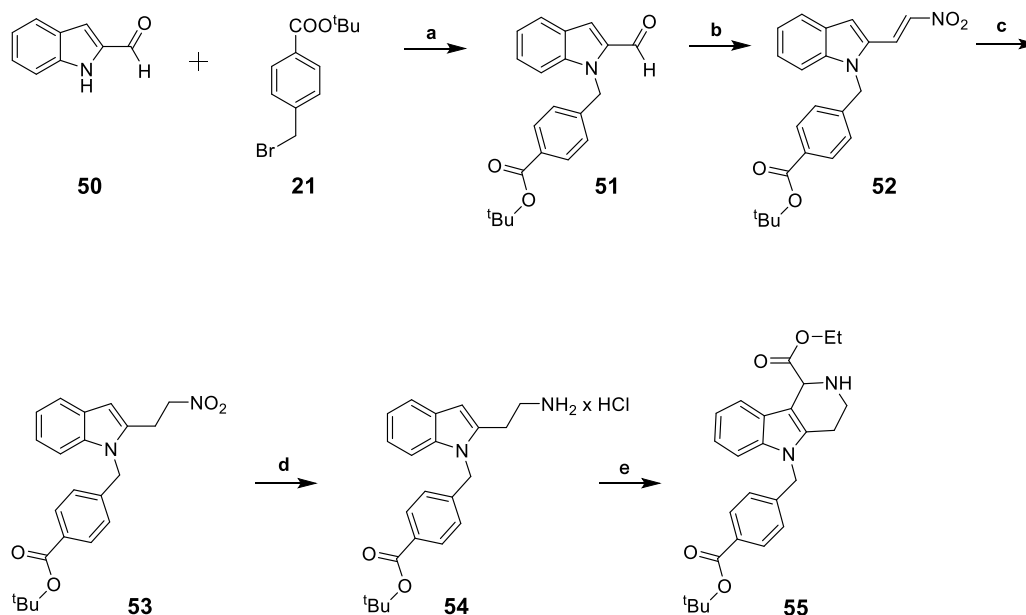
Die Einführung der Seitenkette erfolgte über eine Henry-Reaktion<sup>82</sup> mit dem entsprechenden Nitroalkan<sup>83</sup>. Um das unverzweigte Nitrovinylderivat **42** zu erhalten, wurde Ammoniumacetat als Katalysator verwendet.<sup>84-86</sup> Die Reduktion des Nitroalkens **42** wurde in einer Mischung aus  $\text{CHCl}_3$  / Isopropanol mit  $\text{NaBH}_4$  als Reduktionsmittel durchgeführt und lieferte **43**.<sup>86,87</sup> Aufgrund der Säurelabilität der *tert*-Butyl-Schutzgruppe musste die Vorgehensweise der Reduktion der Nitrogruppe im Vergleich zur bisher beschriebenen Umsetzung bei den Kopfgruppen 1-2 (Zink / 36 %-ige Salzsäure) verändert werden. Daher erfolgte in Anlehnung an die Literatur<sup>59</sup> die Reduktion zu **44** mit Zink in Essigsäure. Die anschließende basische Aufarbeitung mit conc.  $\text{NH}_{3(\text{aq})}$  lieferte die freie Base, welche mit stark verdünnter Salzsäure in das entsprechende Hydrochlorid **44** überführt wurde. Die Cyclisierung des C-Ringes zu **45** erfolgte ausgehend vom  $\beta$ -Arylethylamin **44** durch die Umsetzung mit Ethylglyoxalat im Sinne einer Pictet-Spengler-Reaktion<sup>88</sup> (s. Kap. 3.1).

Der Aufbau des D-Ringes von **46** wurde analog zur Darstellung von **20a** (s. Kap.3.1; **Abb. 3.1**, Reaktionen d-e) durchgeführt, wobei es *in situ* zum Ringschluss kam ohne basische Katalyse durch Cäsiumcarbonat. Die Spaltung der *tert*-Butyl-Schutzgruppe zu **47**, Amidierung mit  $\text{NH}_2\text{OTHP}$  zu **48** sowie die finale Entschützung zu der Zink-chelatisierenden Hydroxamsäure **49** erfolgten nach der für Marbostat-100 (**13a**) beschriebenen Vorgehensweise (s. Kap. 3.1; **Abb. 3.3**, Reaktionen b-d). Die Reaktionen a-d (s. **Abb. 3.9**) führten zu der Verbindung **49**.

### 3.5 Synthese der Inhibitoren mit Kopfgruppe 4 und 5

Der bisher beschriebene Austausch des Tetrahydro- $\gamma$ -carbolin-Grundkörpers (Tubastatin A, **10**) durch eine Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-Grundstruktur sowie die Einführung eines zusätzlichen Ringsystems führten sowohl im enzymatischen- als auch im zellulären Testsystem, insbesondere mit der Kopfgruppe 1, zu sehr guten Ergebnissen. Im Zuge der weiteren Wirkungsoptimierung wurde durch die Synthese vom  $\gamma$ -Marbostat-100-Derivat (**61**, Kopfgruppe 4) ein Vergleich dieser Verbindung mit Tubastatin A (**10**) und Marbostat-100 (**13a**) angestrebt. Dabei sollte zunächst eruiert werden, ob die Leitverbindung Marbostat-100 (**13a**) durch den Austausch der Stickstoff-Position im Grundkörper hinsichtlich ihrer Hemmwirkung verbessert werden kann. Ähnlich zu den Untersuchungen von Marbostat-100 (**13a**, Kopfgruppe 1) und Marbostat-2 (Kopfgruppe 2) sollte zudem überprüft werden, inwieweit ein um eine Methylengruppe erweiterter D-Ring (Kopfgruppe 5) einen Einfluss auf die biologischen Eigenschaften hat.

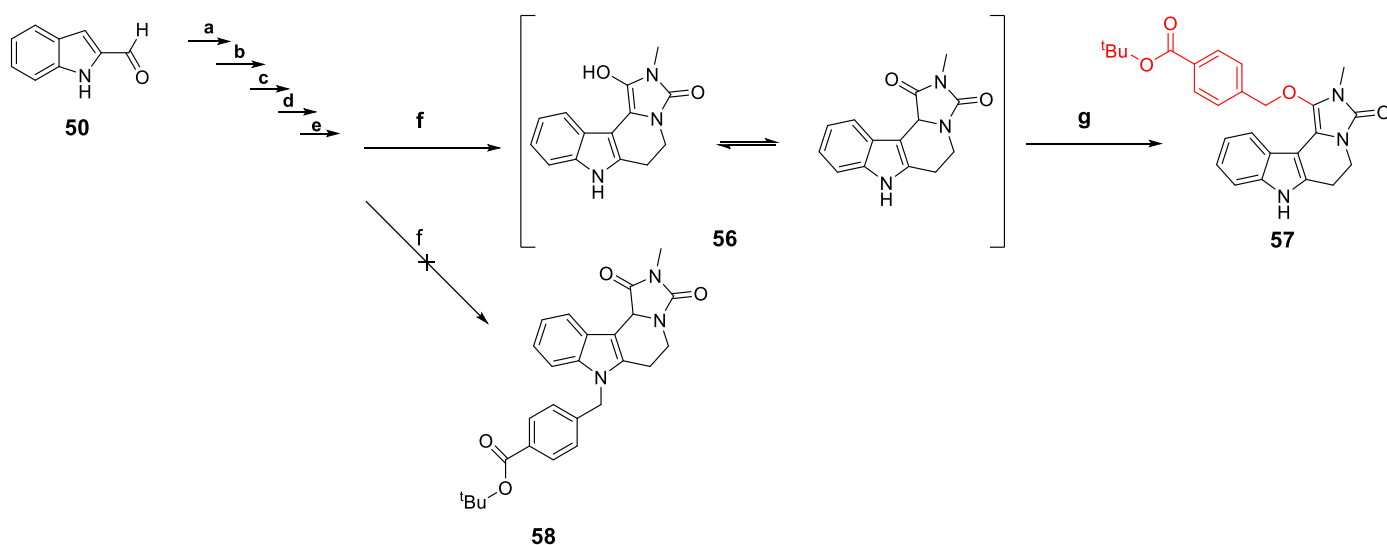
Für die Synthese der HDACis mit den Kopfgruppen 4 und 5 musste zunächst das gemeinsame Intermediat **55** hergestellt werden. Dies erfolgte analog zur Darstellung von **45** (s. **Abb. 3.9**, Reaktionen a-e) unter Verwendung des kommerziell verfügbaren 1*H*-Indol-2-carbaldehyds **50** und führte zu **55** (s. **Abb. 3.10**, Reaktionen a-e).



**Abb. 3.10.** Synthese des Intermediates **55** für die Kopfgruppen 4 und 5. Reagenzien und Bedingungen: (a) DMF, NaH, *tert*-Butyl 4-(bromomethyl)benzoat (**21**, 1 eq), RT., 1 Std; (b) NH<sub>4</sub>OAc, CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, Reflux, 10 Std; (c) CHCl<sub>3</sub>, *i*Prop., NaBH<sub>4</sub>, SiO<sub>2</sub>, RT., 24 Std; (d) (1) HOAc, Zn (1,1 eq), RT., 4 Std, (2) NH<sub>4</sub>OH, (3) THF, HCl; (e) MeOH, SiO<sub>2</sub>, Ethylglyoxal, RT., 1 Std.

Die Einführung des Benzyl-Spacers musste, wie auch bei der Darstellung von **49**, der vollständigen Kopfgruppen-Synthese vorgezogen werden. Die bisher etablierte Methode in Dimethylformamid unter Verwendung von NaH als Base hatte zur Folge, dass die Alkylierung durch den Benzyl-Spacer an der durch Tautomerie entstehenden Enol-Form von **56** zu **57** erfolgte, statt am Indol-Stickstoff (s. **Abb. 3.11**). Die Alkylierung zum Produkt **57** konnte mittels 2D-NMR-Spektroskopie gezeigt werden.

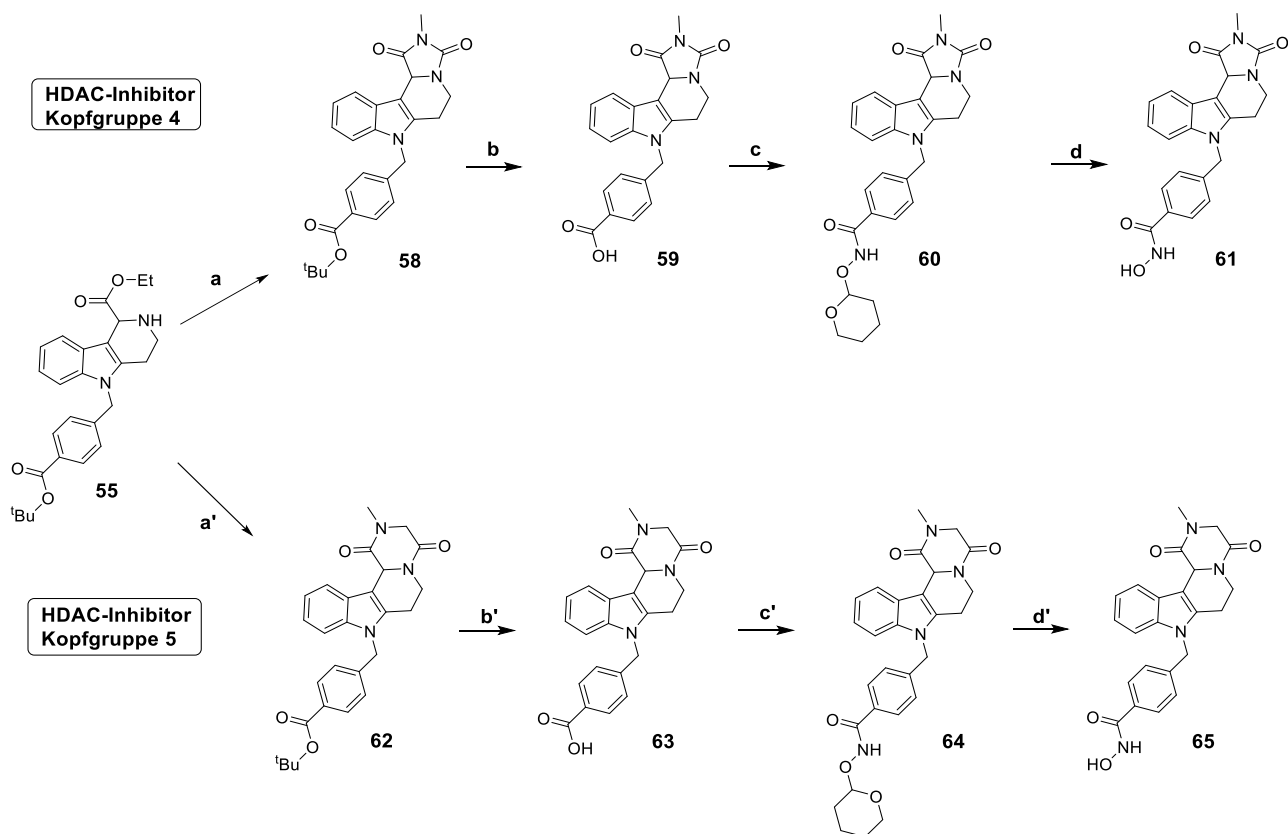
Da aus der Literatur<sup>89</sup> bekannt ist, dass das Gleichgewicht zwischen Keto- und Enol-Form von Faktoren wie Temperatur, Lösungsmittel und verwendeter Base abhängig ist, wurde die bereits beschriebene alternative Alkylierungsrout mit Kaliumcarbonat gewählt (vgl. **Abb. 3.4**, Reaktion d). Diese ermöglichte die Alkylierung am Indol-Stickstoff, führte jedoch im Vergleich zur beschriebenen Syntheseroute von **51** zu schlechteren Ausbeuten (64 vs. 17 %).



**Abb. 3.11.** Alkylierung am Beispiel von **58** bei einem Aufbau der Kopfgruppen und anschließender Alkylierung. Reagenzien und Bedingungen: (a)  $\text{NH}_4\text{OAc}$ ,  $\text{CH}_3\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_2$ , Reflux, 1,5 Std; (b)  $\text{CHCl}_3$ ,  $i\text{Prop.}$ ,  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{SiO}_2$ , RT., 24 Std; (c) (1)  $\text{HOAc}$ ,  $\text{Zn}$  (1,1 eq), RT., 4 Std, (2)  $\text{NH}_4\text{OH}$ , (3)  $\text{THF}$ ,  $\text{HCl}$ ; (d)  $\text{MeOH}$ ,  $\text{SiO}_2$ , Ethylglyoxalat, RT., 2 Std; (e) (1)  $\text{MeCN}$ ,  $\text{DIPEA}$  (3,5 eq), 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl methylcarbammat (1,1 eq), RT., 16 Std; (2)  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , Dioxan, Reflux; (f)  $\text{DMF}$ ; (g)  $\text{NaH}$  (1,1 eq), *tert*-Butyl 4-(brommethyl)benzoat (**21**, 1 eq), RT., 15 min.

Ausgehend vom Intermediat **55** erfolgten (s. **Abb. 3.12**) über die für **46** etablierte Ringschluss-Methode die Darstellung von **58** (vgl. **Abb. 3.9**, Reaktion f), die Spaltung der *tert*-Butyl-Schutzgruppe zu **59**, die Amidierung mit  $\text{NH}_2\text{OTHP}$  zu **60** und die Freisetzung der Hydroxamsäure **61** (vgl. Kap. 3.1; **Abb. 3.3**, Reaktionen b-d).

Um den HDACi **65** mit einer zusätzlichen Methylen-Gruppe im D-Ring zu erhalten, wurde zunächst das Intermediat **55** in die freie Base überführt und das sekundäre Amin durch Chloracetylchlorid acyliert (s. **Abb. 3.12**, Reaktion a').<sup>90-93</sup> Anschließend erfolgte eine nucleophile Substitution mit Methylamin, wodurch es unter Spaltung des Ethylesters direkt zum Ringschluss **62** kam.<sup>90,93,94</sup> Die folgenden Reaktionsschritte (s. **Abb. 3.12**, Reaktionen b'-d'), die zur Endverbindung **65** führten, wurden in Analogie zur Synthese von Marbostat-100 (**13a**) durchgeführt (vgl. Kap. 3.1; **Abb. 3.3**, Reaktionen b-d).



**Abb. 3.12.** Synthese der HDACi mit Kopfgruppen 4 und 5. Reagenzien und Bedingungen: (a) MeCN, DIPEA (3,5 eq), 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl methylcarbamate (1,1 eq), RT., 16 Std; (b) TFA, RT.; (c) DMF, BOP (**24**, 1,2 eq),  $\text{NH}_2\text{OTHP}$  (**25**, 4 eq),  $\text{Et}_3\text{N}$  (3 eq), RT, 2 - 3 Std; (d) MeOH,  $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ , RT.; (a') (1) DIPEA (3,5 eq), DCM,  $\text{ClCH}_2\text{COCl}$ ,  $-50\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 0\text{ }^\circ\text{C}$ , (2)  $\text{CH}_3\text{NH}_2$ , MeOH, RT., 16 Std; (b') DCM,  $\text{CF}_3\text{COOH}$ , 16 Std, RT.; (c') THF, BOP (**24**, 1,2 eq),  $\text{NH}_2\text{OTHP}$  (**25**, 4 eq),  $\text{Et}_3\text{N}$  (3 eq), RT., 3,5 Std, (d') MeOH, THF, DCM,  $\text{HCl}_{(\text{iprop})}$ , RT..

## 3.6 Synthese des Inhibitors mit Kopfgruppe 6

Alle bisher vorgestellten Verbindungen weisen entweder einen Tetrahydro- $\beta$ -carbolin- (Kopfgruppen 1-3) oder einen Tetrahydro- $\gamma$ -carbolin-Grundkörper (Kopfgruppe 4 und 5) auf, die durch ein zusätzliches Ringsystem (D-Ring) erweitert wurden. Um zusätzliche Informationen über die Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu erhalten, wurden weitere Modifikationen am Grundkörper im Sinne einer „Scaffold Hopping-Strategie“ durchgeführt, wodurch Derivate mit der Kopfgruppe 6 entstanden.

### 3.6.1 Scaffold Hopping

Im Jahr 1999 wurde von Schneider *et al.*<sup>95</sup> der Ausdruck „Scaffold Hopping“ geprägt.<sup>96</sup> Das „Scaffold Hopping“-Konzept beruht darauf, neue Verbindungen zu finden, die sich im zentralen Bereich ihrer Molekülstruktur von der Grundstruktur eines bekannten aktiven Wirkstoffes unterscheiden, jedoch in ihrer spezifischen biologischen Aktivität diesem ähnlich

sind.<sup>96,97</sup> Damit stellt das „Scaffold Hopping“ eine Erweiterung des Bioisosterie-Prinzips dar, da nicht nur einzelne Atome oder funktionelle Gruppen ausgetauscht werden, sondern der gesamte zentrale Kernbereich.<sup>98,99</sup>

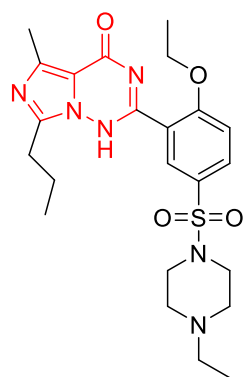
Auf dem ersten Blick scheint die „Scaffold“-Methode im Widerspruch mit dem „Similarity Property“-Prinzip zu stehen, welches die Grundlage der modernen Wirkstoffentwicklung darstellt.<sup>96</sup> Dieses Prinzip besagt, dass Verbindungen mit ähnlicher Struktur häufig die gleichen physikochemischen Eigenschaften und biologische Wirksamkeit aufweisen.<sup>96,97</sup> Bei genauer Betrachtung wird jedoch deutlich, dass dieses Prinzip die Möglichkeit der Bindung von strukturell verschiedenen Verbindungen an dasselbe Target nicht ausschließt.<sup>96</sup> Aufgrund dessen, dass bei der Anwendung der „Scaffold Hopping“-Methode die Beibehaltung des Wirkmechanismus im Vordergrund steht, wird das „Similarity Property“-Prinzip eingehalten, da Liganden, die in dieselbe Bindungstasche hineinpassen, strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen müssen.<sup>96</sup>

Diese Strategie sollte zunächst als Unterstützung für die computerbasierten virtuellen Hochdurchsatz-Screening-Methoden dienen, wo sie sich bereits im Vergleich zur konventionellen Suche nach ganzen Molekülen bewährt hat.<sup>97</sup> Neben diesem Einsatzgebiet findet dieses Konzept jedoch auch Anwendung in der Grundlagenforschung der medizinischen Chemie.<sup>97</sup>

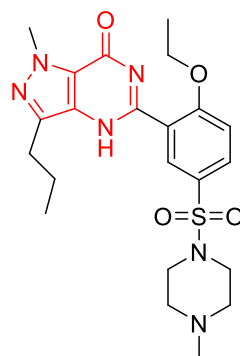
Ziel dieser Herangehensweise ist es, alternative Wirkstoffe unter Optimierung von Leitverbindungen zu finden.<sup>97</sup> Die Änderung des Grundgerüsts kann in diesem Bereich aus verschiedenen Gründen wünschenswert sein:

- Austausch von chemisch komplexen Naturstoffen durch synthetisch leicht zugängliche Moleküle.<sup>97</sup>
- Verbesserung der pharmakologischen Eigenschaften bekannter Verbindungen.<sup>97</sup>
- Optimierung der Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und Target.<sup>98</sup>
- Umgehung des Patentschutzes.<sup>96</sup>

Ein bekanntes Beispiel für den zuletzt genannten Grund war die Entwicklung des Phosphodiesterase-Hemmer vom Typ 5 (PDE 5) Vardenafil **66** mit dem durch eine „Scaffold“-Modifikation der Patentschutz von Sildenafil **67** umgangen und eine schnellere Anflutung des Wirkstoffes erreicht werden konnte (s. **Abb. 3.13**).<sup>96</sup>



Vardenafil **66**



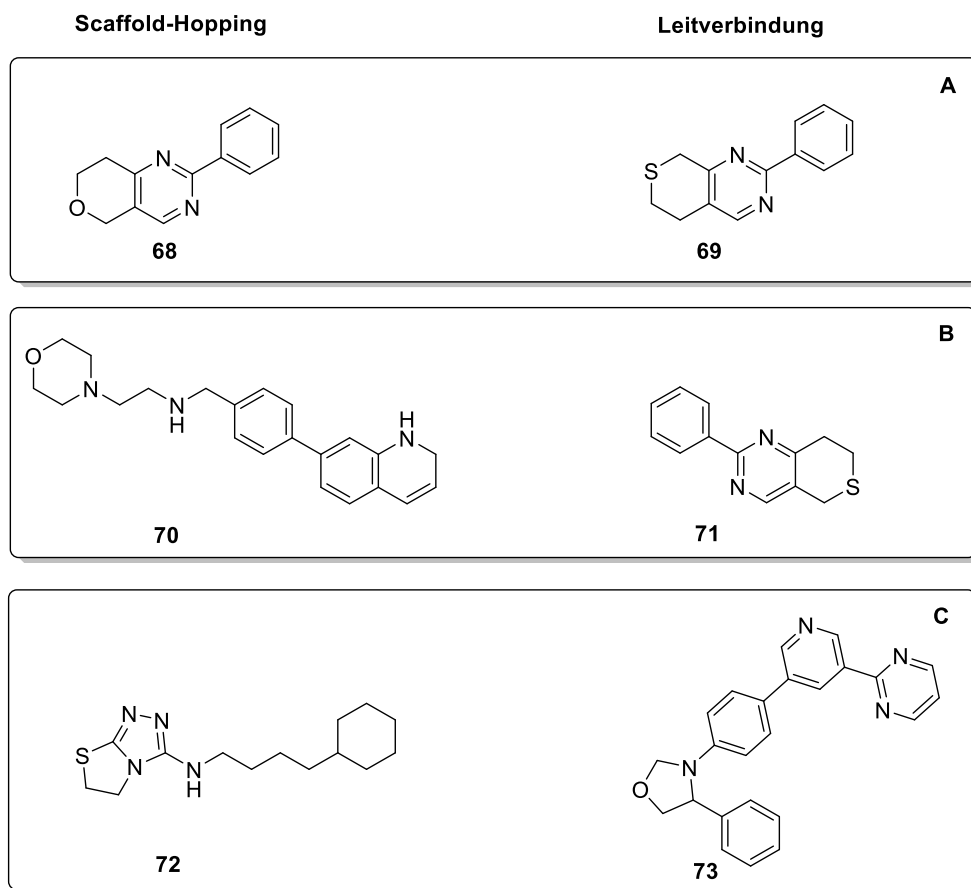
Sildenafil **67**

**Abb. 3.13.** Darstellung des Scaffolds-Konzepts zur Umgehung des Patentschutzes am Beispiel der PDE-5-Hemmer Vardenafil (**66**) und Sildenafil (**67**) in Anlehnung an die Lit.<sup>96</sup>

In der Literatur existieren mehrere Definitionen zu „Scaffold“, wobei die von Bemis und Murcko<sup>100</sup> (BM) eingeführte die höchste Relevanz in der medizinischen Chemie erlangt hat.<sup>97</sup>

Demnach können „Scaffold“-Modifikationen unterschiedliches Ausmaß haben (s. **Abb. 3.14**)<sup>97</sup>:

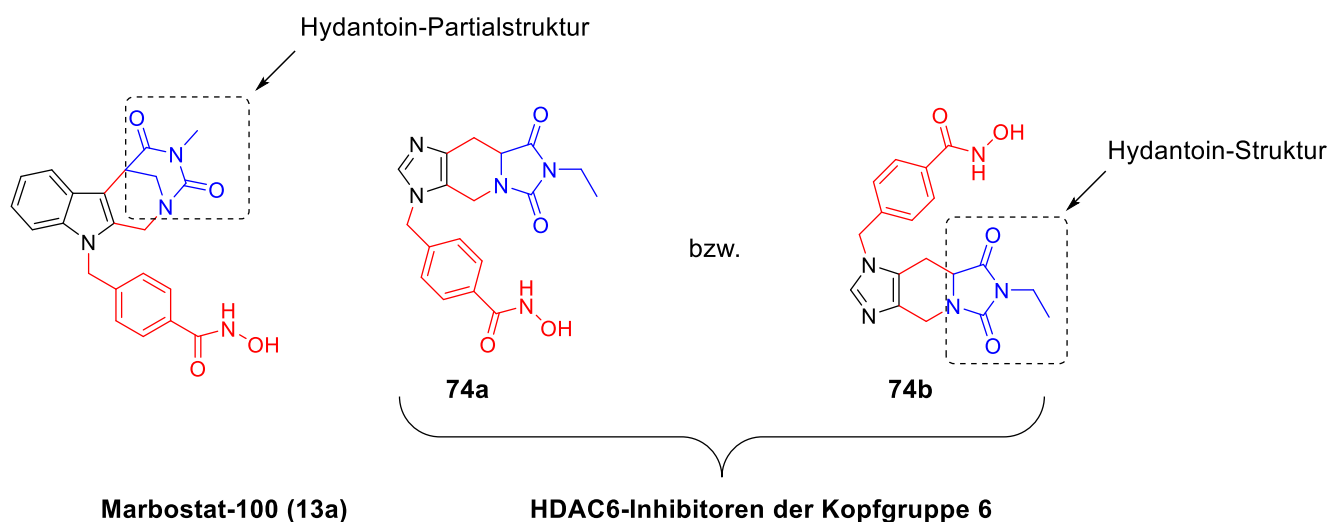
- Sie können sich nur in einer Substitution oder durch Austausch eines Heteroatoms von der Ausgangsverbindung unterscheiden (A).
- Sie teilen sich strukturelle Elemente mit der Ausgangsverbindung, weisen jedoch eine andere Topologie (räumliche Anordnung) auf (B).
- Sie können durch den Austausch des kompletten Ringsystems ausgeprägte Abweichungen zur Original-Grundstruktur aufweisen (C).



**Abb. 3.14.** Repräsentative Beispiele für „Scaffold Hoppings“ ausgehend von der Definition nach Bemis und Murcko in Anlehnung an Lit.<sup>97</sup>. (A) zeigt „Scaffold Hoppings“ mit großer Ähnlichkeit zur Ausgangsverbindung. (B) zeigt „Scaffold Hoppings“ mit strukturell ähnlichen Elementen, aber unterschiedlicher Topologie. (C) zeigt „Scaffold Hoppings“, die sich deutlich von der Ausgangsverbindung unterscheiden.

Der Ansatz des „Scaffold Hoppings“ ermöglicht somit maximale chemische Diversität, während die biologische Aktivität sowie das pharmakologische Profil der Ausgangsverbindung beibehalten oder sogar verbessert werden können.<sup>96</sup>

Aus diesem Grund sollte für die Derivate der Kopfgruppe 6 der zentrale Bereich der Leitverbindung Marbostat-100 (**13a**) insofern verändert werden, als dass Strukturelemente, die entscheidend für die Interaktion des Inhibitors mit dem Target-Enzym sind, erhalten blieben oder nur geringfügig, wie im Fall der Hydantoin-Struktur (Austausch Hydantoin-Partialstruktur durch Hydantoin-Struktur) modifiziert wurden (s. **Abb. 3.15**). Neben dieser Modifikation wurde der Benzyl-Linker mit der Zink-chelatisierenden Hydroxamsäure beibehalten, wodurch der gleiche Wirkungsmechanismus gewährleistet werden sollte (s. **Abb. 3.15**).



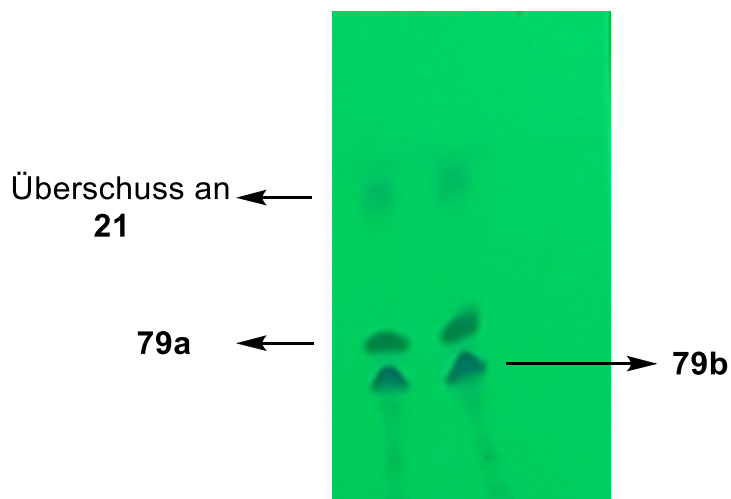
**Abb. 3.15.** Vergleich der Grundstruktur von Marbostat-100 (**13a**) mit der durch „Scaffold Hopping“ entstandenen HDAC6i **74a** und **74b**. Die *rot* dargestellten Struktur-Elemente weisen auf Gemeinsamkeiten mit der Leitverbindung **13a** hin, während die blau eingerahmten Fragmente geringfügige Modifikationen kennzeichnen. Die *schwarz* dargestellten Struktur-Elemente zeigen die deutlichen Unterschiede, bedingt durch das „Scaffold Hopping“, auf.

Für die Darstellung der Kopfgruppe 6 (s. **Abb. 3.17.**), wurde ausgehend von der kommerziell zur Verfügung stehenden racemischen Aminosäure Histidin **75** das Hydrochlorid-Salz im Sinne einer Pictet-Spengler-Reaktion zu **76** umgesetzt.<sup>101,102</sup> Anschließend wurde die Carbonsäure durch Thionylchlorid aktiviert und mit Methanol zu **77** verestert.<sup>103</sup> Das aus der Reaktion des Thionylchlorides mit dem Alkohol entstehende Methylchlorsulfat stellt das reaktive Intermediat dar.<sup>104</sup> Des Weiteren erfolgt als Nebenprodukt die Freisetzung von HCl, welche dazu führte, dass **77** als Hydrochlorid gewonnen werden konnte.<sup>104</sup> Der Aufbau des linear anellierten C-Ringes erfolgte direkt mit Ethylisocyanat unter basischer Katalyse und lieferte die trizyklische Kopfgruppe **78**.<sup>105</sup> Die Bildung des Methylesters **77** als Zwischenstufe diente der Verbesserung der Ausbeute von **78**, da in der Literatur gezeigt werden konnte, dass das Carbonsäure-Derivat **76** als Ausgangsverbindung für den Ringschluss (C-Ring) zu einer schlechteren Aubeute führt.<sup>105</sup>

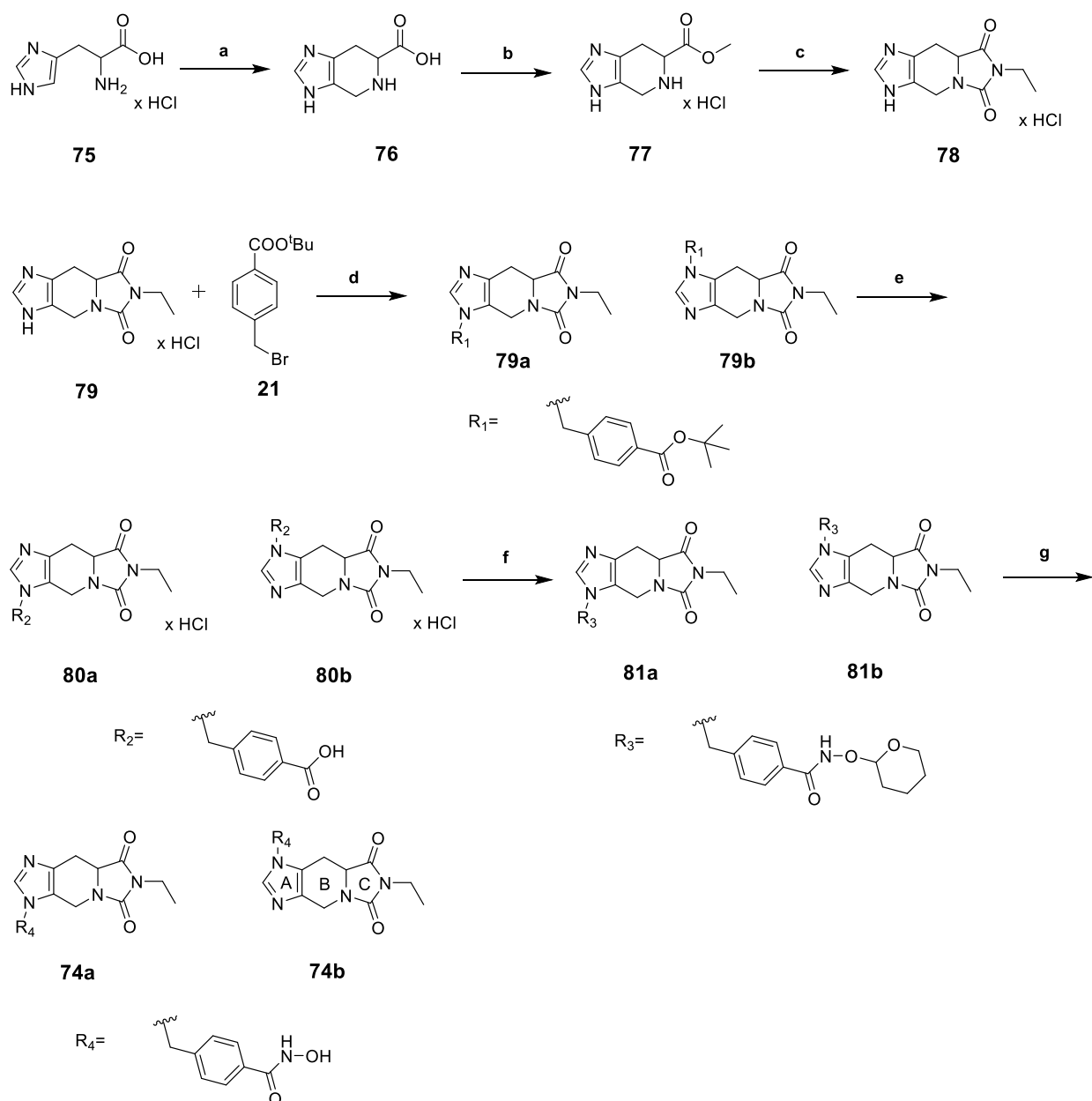
Da die Ausbeute von **78** trotz Berücksichtigung der Empfehlung von Brana *et al.*<sup>105</sup> sehr gering war (11 %), wurde für die Alkylierung im Anschluss die mildere Methode mit Kaliumcarbonat (s. Kap. 3.1; **Abb. 3.4**, Reaktion d) gewählt. Die Reinigung (Abtrennung der Base) erfolgte bei dieser Methode einfacher und führte daher zu geringeren Produktverlusten im Vergleich zur Methode mit NaH als Base. Dies führte jedoch zu den Regioisomeren **79a** und **79b**, da beide Stickstoff-Atome der Imidazol-Einheit (N-1 und N-3) durch Umlagerung der Doppelbindung (Tautomerie) für die Alkylierung mit **21** zur Verfügung standen. Die beiden Konstitutionsisomere konnten durch sukzessive Anreicherung säulen-



chromatographisch gewonnen werden (s. **Abb. 3.16**). Nach der aufwändigen Abtrennung (dreimalige Säulenchromatographie) war die Charakterisierung von **79a** und **79b** mittels 2D-NMR-Spektroskopie möglich (s. Kap. 3.6.2). Hierbei konnte **79a** mit einer Ausbeute von 16 % und **79b** mit einer Ausbeute von 6 % gewonnen werden (s. **Abb. 3.17**, Reaktionen e-g). Dabei erfolgten die Spaltung des *tert*-Butylesters **80a** und **80b** mit HCl, die Amidierung mit NH<sub>2</sub>OTHP **81a** und **81b**, sowie die Freisetzung der Hydroxamsäure-Derivate **74a** und **74b** analog zur Darstellung von Marbostat-100 (**13a**) (s. Kap. 3.1; **Abb. 3.3**, Reaktionen b-d). Die Gewinnung beider Konstitutionsisomere ermöglichte weitere Einblicke, inwieweit die räumliche Ausrichtung des Benzyl-Linkers und damit der Zink-chelatisierenden Hydroxamsäure für die biologische Aktivität entscheidend sind.



**Abb. 3.16.** Dünnschichtchromatogramm (SiO<sub>2</sub>) der beiden Regioisomere **79a** und **79b**.



**Abb. 3.17.** Synthese der HDAC6i mit Kopfgruppe 6. Reagenzien und Bedingungen: (a)  $\text{H}_2\text{O}$ , 36 % Formaldehyd(aq) (2 eq), Reflux, 24 Std; (b) (1)  $\text{MeOH}$ ,  $0^\circ\text{C}$ ,  $\text{SOCl}_2$  (2 eq); (2)  $95^\circ\text{C}$ , 24 Std; (c)  $\text{EtNCO}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{DMF}$ ,  $60^\circ\text{C}$ , 24 Std; (d) 2-Butanon,  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (3,5 eq), *tert*-Butyl 4-(brommethyl)benzoat (**21**, 1,5 eq), RT., 24 Std; (e)  $\text{DCM}$ , 5 N  $\text{HCl}_{(\text{iprop})}$ , RT., 48 Std; (f)  $\text{DMF} / \text{THF}$  (1:1), BOP (**24**, 1,2 eq), DIPEA (3,5 eq),  $\text{NH}_2\text{OTHP}$  (**25**, 3 eq), RT., 24 Std; (g)  $\text{MeOH}$ , 5 N  $\text{HCl}_{(\text{iprop})}$ , RT..

### 3.6.2 Charakterisierung von 79a und 79b mittels 2D-NMR-Spektroskopie

Das erste zweidimensionale (2D) homonukleare NMR-Experiment wurde 1970 von Jean Jeener<sup>106</sup> entwickelt. Danach folgten weitere 2D-Verfahren, wie beispielsweise das im Folgenden beschriebene NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*)<sup>107</sup>-Experiment, welches in **Abb. 3.18** und **3.19** dargestellt ist. Das NOESY-Spektrum ermöglicht es, räumliche Abstände von koppelnden Kerndipolen über deren Wechselwirkung zu bestimmen, sofern dieser Abstand im Raum nicht mehr als 5 Å beträgt.<sup>107</sup>

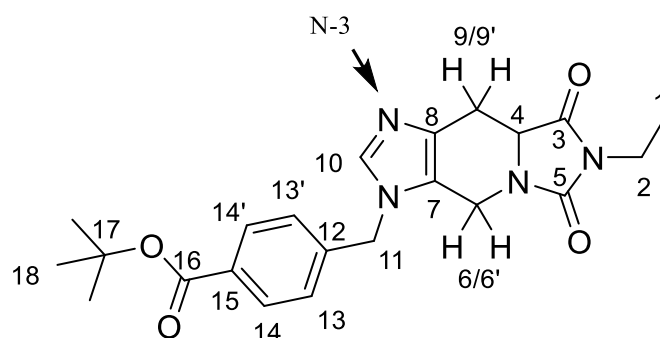
Für die in diesem Fall vorliegende Problemstellung sollten räumlich benachbarte Protonen zugänglich gemacht werden, weswegen ein homonukleares <sup>1</sup>H / <sup>1</sup>H-NOESY-Experiment durchgeführt wurde.

Die vorgehende Zuordnung aller Signale erfolgte mittels <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, sowie unter Zuhilfenahme der weiteren 2D-Verfahren, wie <sup>1</sup>H / <sup>1</sup>H-COSY (*correlation spectroscopy*) und <sup>1</sup>H / <sup>13</sup>C-HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*, alle ohne Abbildung).<sup>108</sup>

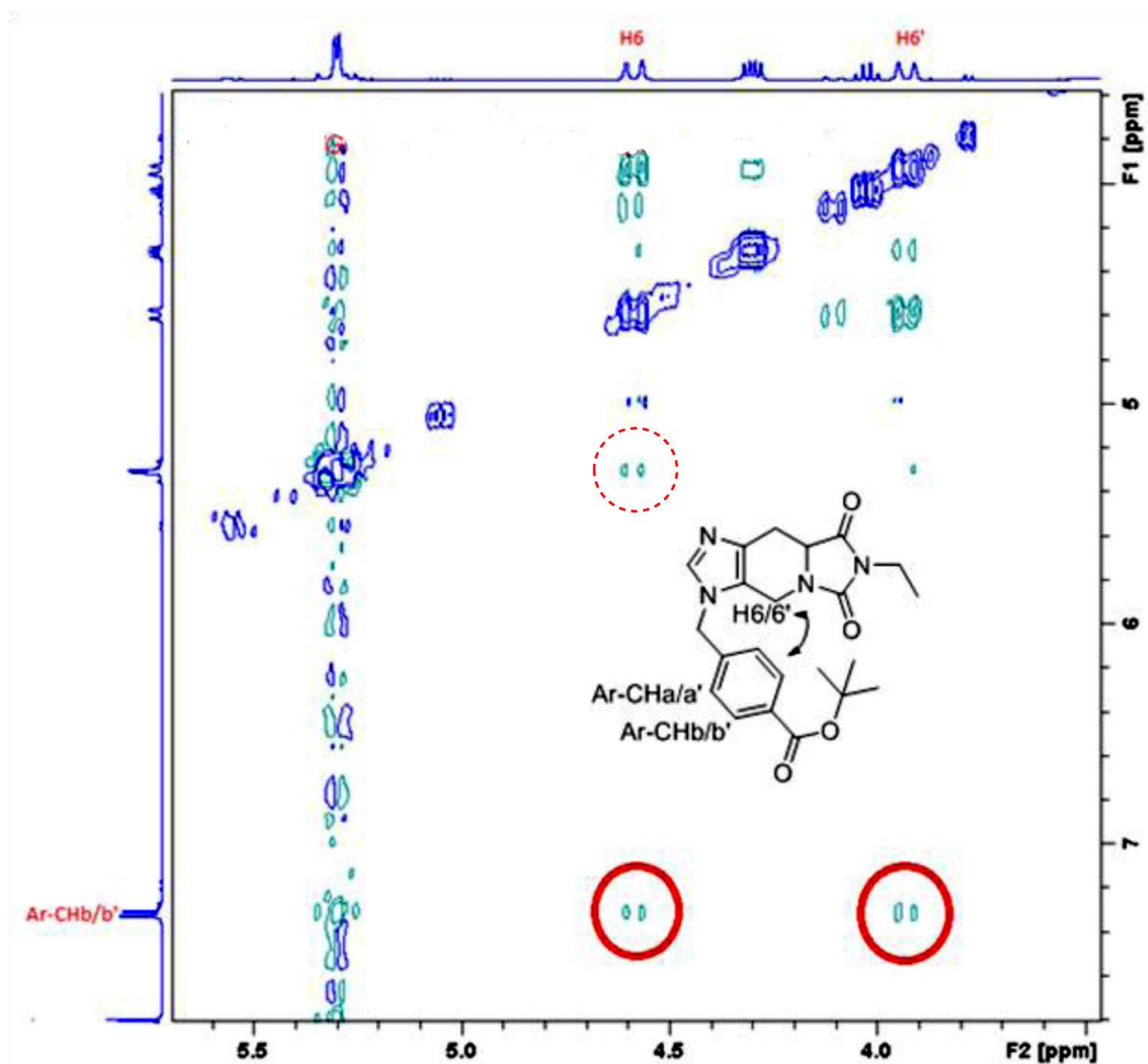
Da beim <sup>1</sup>H / <sup>1</sup>H-NOESY-Experiment auf beiden Achsen jeweils die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren aufgetragen werden, ergeben sich Diagonal- und Kreuzsignale (s. **Abb. 3.18** und **3.19**).<sup>109</sup> Dabei können die erstgenannten für die Auswertung vernachlässigt werden, da diese nur Signale darstellen, die durch Kreuzsignale der Kerne mit sich selbst entstehen (s. **Abb. 3.18** und **3.19**, in blau dargestellt).<sup>108</sup> Kreuzsignale (NOEs) hingegen geben Auskunft über die räumliche Abstände zweier Protonen an.<sup>110</sup> Wie in **Abb. 3.18** und **3.19** deutlich wird, unterscheiden sich diese in ihrer Signalintensität, wobei intensive Kreuzsignale auf kurze Kern- (Protonen) abstände, während schwache Kreuzsignale auf größere räumliche Abstände (< 5 Å) hindeuten.<sup>107,109,110</sup>

Um die Regioisomere **79a** und **79b** strukturell charakterisieren zu können, wurden zunächst alle Signale über die im Kap. 3.6.2 erläuterten spektroskopischen Verfahren, sowie zusätzlich durch ein <sup>1</sup>H / <sup>13</sup>C-HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*)<sup>108</sup>-Spektrum identifiziert (Spektren nicht abgebildet). Durch die zusätzliche Messung des <sup>1</sup>H / <sup>13</sup>C-HSQC-Spektrums konnte jedes Proton im Molekül dem zugehörigen Kohlenstoff zugeordnet werden. Aus **Abb. 3.18** und **3.19** wird ersichtlich, dass im Fall einer Alkylierung am N-1-Atom die Protonen H6 / H6' mit H13 / 13' zu Korrelationssignalen führen müssen, während eine Alkylierung des Benzyl-Spacers am N-3-Atom Kreuzsignale zwischen H9 / H9' und H13 / 13' impliziert. Diese beschriebene theoretische Differenzierung der Regioisomere **79a** und **79b** konnte mit dem jeweiligen <sup>1</sup>H / <sup>1</sup>H-NOESY-Spektrum belegt werden.

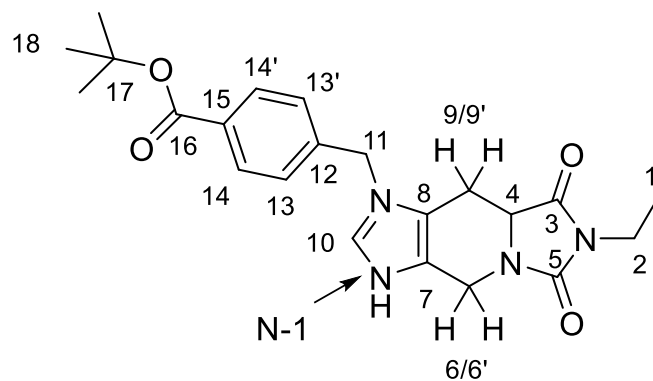
Dabei konnte eine Korrelation zwischen H13 / 13' bei 7.31 / 7.90 ppm und H6 / 6' bei 4.59 / 3.92 ppm (s. **Abb. 3.19**, rote Kreise) sowie eine Korrelation zwischen H13 / 13' und H9 / 9' bei 2.90 / 2.63 ppm (s. **Abb. 3.18**, rote Kreise) festgestellt werden. Deutlich schwächere Kreuzresonanzsignale über den Raum konnten zwischen H6 / 6' und H11 sowie zwischen H9 / 9' und H11 beobachtet werden (s. **Abb. 3.18** und **3.19**, gestrichelte rote Kreise), die im Einklang mit der vorgenommenen Zuordnung stehen. Damit konnte einerseits die Tatsache belegt werden, dass die Alkylierung an unterschiedlichen Stickstoffen des Imidazol-Ringes stattgefunden hat und andererseits eine eindeutige Charakterisierung der jeweiligen Konstitutionsisomere **79a** und **79b** vorgenommen werden. Die Strukturen aller nachfolgenden Reaktionsprodukte **80a**, **80b**, **81a**, **81b**, **74a** und **74b** (s. **Abb. 3.17**, Reaktionen e-g) wurden stets mittels 2D-NMR-Spektroskopie verifiziert.



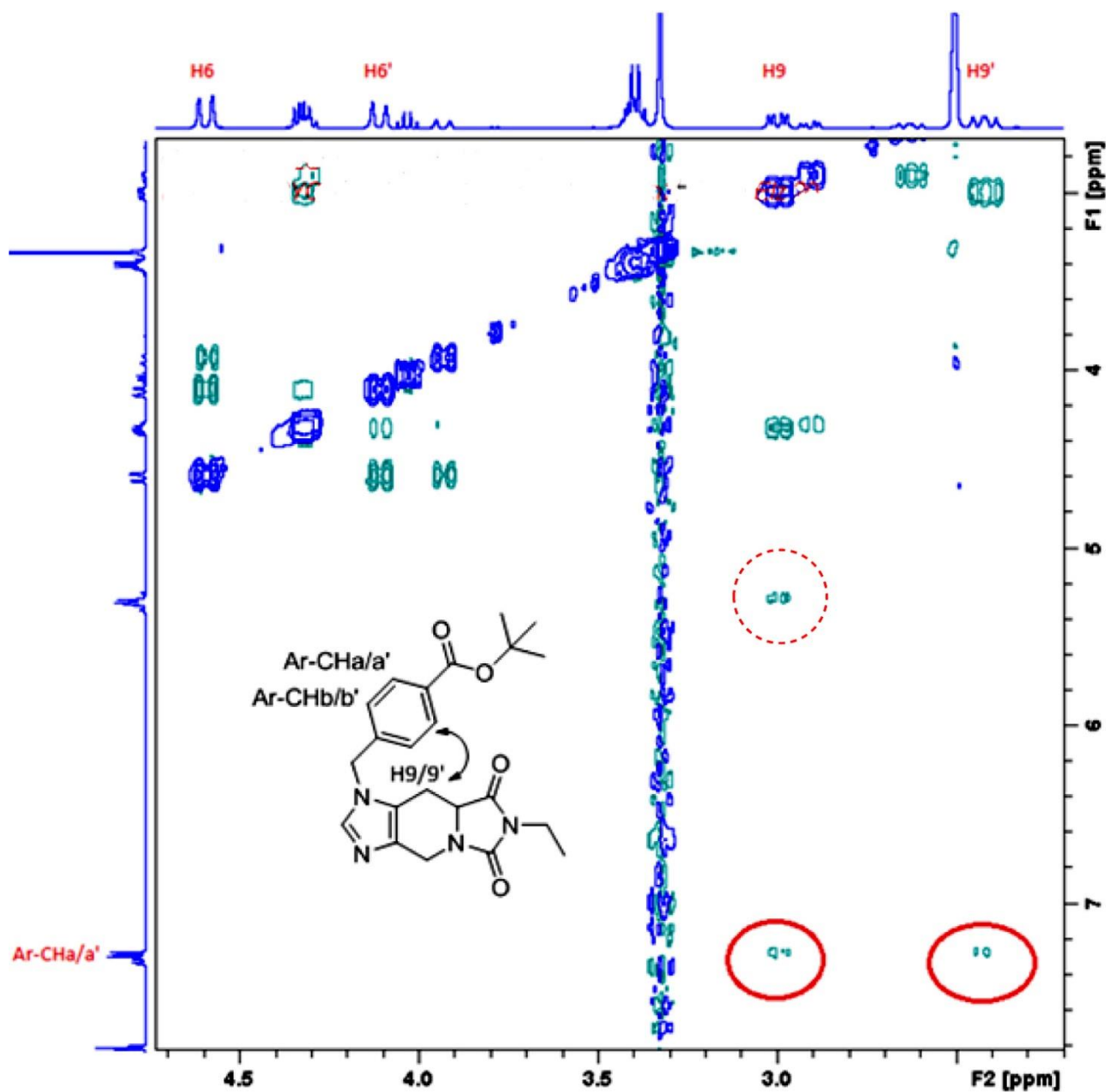
**79a**



**Abb. 3.18.** Ausschnitt  $^1\text{H} / ^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum von **79a** ( $^1\text{H}$ -400 MHz),  $\text{DMSO-}d_6$ , 20,05 °C). Um eine übersichtliche Nummerierung zu gewährleisten wurde die unten dargestellte Verbindung gedreht.



**79b**



**Abb. 3.19.** Ausschnitt aus dem  $^1\text{H} / ^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum von **79b** ( $^1\text{H}$ -(400 MHz),  $\text{DMSO}-d_6$ , 20,25 °C). Um eine übersichtliche Nummerierung zu gewährleisten wurde die unten dargestellte Verbindung gedreht

### 3.7 Enantioselektive Synthese der Inhibitoren mit Kopfgruppe 1

Nachdem die Synthese der HDAC6i mit der Kopfgruppe 1 die Leitverbindung Marbostat-100 (**13a**) lieferte, welche im Zuge der biologischen Untersuchung hervorragende inhibitorische Wirkungen aufwies, sollte in weiterer Folge evaluiert werden, inwieweit die ermittelte inhibitorische Aktivität von stereochemischen Eigenschaften abhängt.

Bereits um 1900 gelang es Cushney zu belegen, dass die beiden Enantiomere eines Wirkstoffes unterschiedliche biologische Wirkungen aufweisen können (vgl. Kap. 7.9.2).<sup>111</sup>

Zur Darstellung des enantiomerenreinen Marbostat-100-Grundkörper wurden drei verschiedene Ansätze untersucht:

- 1) Biotechnologische Methode
- 2) Diastereomerentrennung
- 3) Asymmetrische Synthese unter Zuhilfenahme eines chiralen Katalysators

#### 3.7.1 Biotechnologisches Verfahren zur Synthese des enantioselektiven Marbostat-100-Grundkörpers

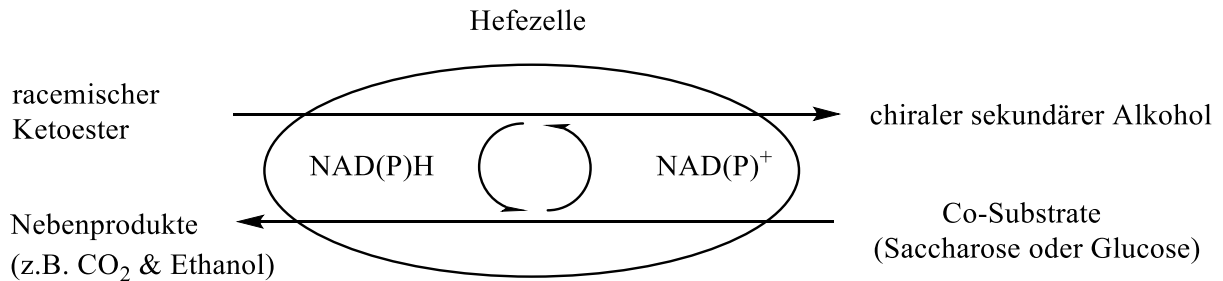
Da die asymmetrische Synthese in klassischen chemischen Verfahren oftmals an einen hohen Verbrauch an organischen Lösungsmitteln gekoppelt ist, geringe Ausbeuten in Verbindung mit einer unzureichenden Enantiomerenreinheit liefert und den Einsatz von teuren Schwermetallkatalysatoren benötigt, wurde zunächst nach einem alternativen Verfahren gesucht.<sup>112,113</sup>

Dabei fiel die Wahl auf die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, die in großen Mengen leicht verfügbar ist, eine leichte Handhabung ermöglicht, nur milde Bedingungen (Raumtemperatur) benötigt, keine Pathogenität aufweist und zudem ein molekularbiologisch gut erforschter Modellorganismus ist.<sup>112,114</sup>

Dieser eukaryotische Modellorganismus kann für verschiedene stereospezifische Reduktionen eingesetzt werden.<sup>112,114-116</sup> Dazu zählen Reduktionen von aliphatischen, heterocyclischen und cyclischen Mono- und Dicarbonylverbindungen.<sup>112,115,117</sup> Des Weiteren kann die Bäckerhefe für die stereoselektive Reduktion von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketoestern verwendet werden, weswegen sie für die vorliegende Aufgabenstellung herangezogen wurde.<sup>115</sup>

Für die Durchführung der biokatalytischen Methode wurde auf die Isolierung der für die Reduktion zuständigen Enzyme (Oxidoreduktasen) aus Kostengründen verzichtet und stattdessen der gesamte Zellorganismus verwendet. Dies wird als eine durchaus vertretbare

Vorgehensweise in der Literatur<sup>113,114</sup> beschrieben, da Enzyme im Zellsystem eine höhere Stabilität aufweisen, womit der Einsatz im Rahmen der hier vorliegenden Aufgabenstellung seine Berechtigung findet.

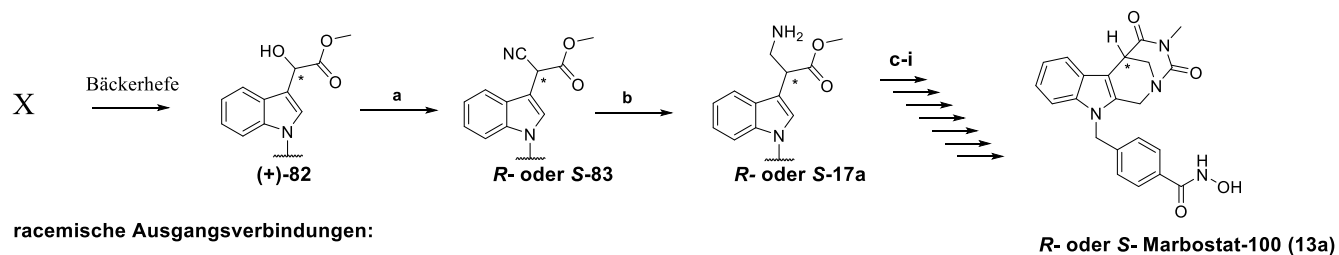


**Abb. 3.20.** Asymmetrische Reduktion eines Ketoesters mit Hilfe der Bäckerhefe in Anlehnung an Lit..<sup>115</sup>

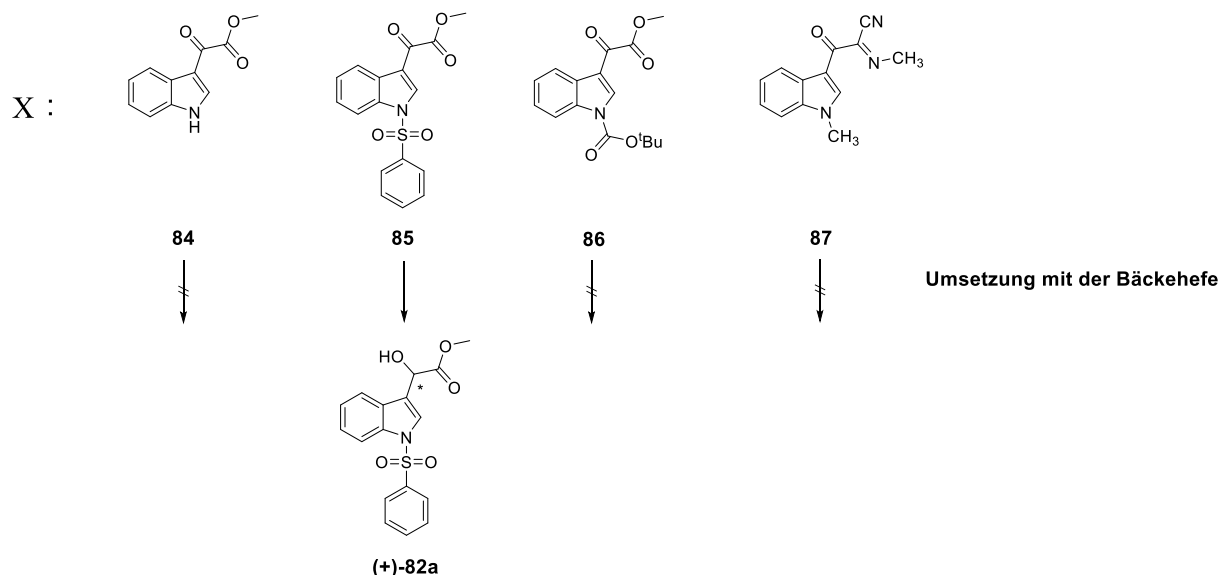
Der racemische Ketoester diffundiert in die Hefezelle (s. **Abb. 3.20**), wo er durch Oxidoreduktasen reduziert und der entsprechende chirale sekundäre Alkohol gebildet wird.<sup>115</sup> Bei dieser Redoxreaktion wird gleichzeitig der Co-Faktor NAD(P)H zu NAD(P)<sup>+</sup> oxidiert.<sup>115</sup> Für die Regeneration des NAD(P)Hs wird ein Co-Substrat benötigt. In der Regel wird eine günstige Kohlenstoffquelle wie Glucose oder Saccharose verwendet.<sup>113,115</sup> Nebenprodukte, die aufgrund der Metabolisierung entstehen, sind hauptsächlich Ethanol und Kohlenstoffdioxid.<sup>115</sup>



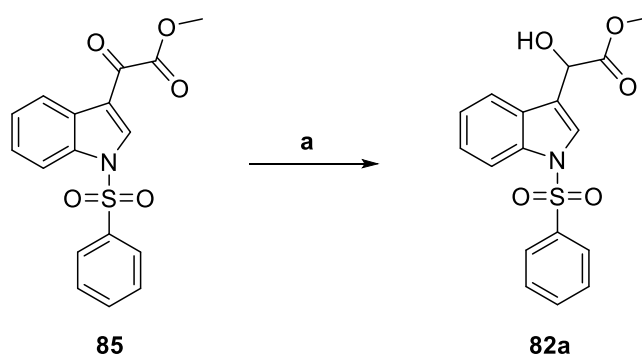
geplante Syntheseroute:



racemische Ausgangsverbindungen:



**Abb. 3.21.** Geplante Syntheseroute für die Enantiomere *R*- und *S*-Marbostat-100 (**13a**), sowie die dafür in Frage kommenden racemischen Ausgangsverbindungen **X**. Reagenzien und Bedingungen: (a) Durchführung in Anlehnung an Lit.<sup>118-121</sup>; (b) Durchführung in Anlehnung an Lit.<sup>122-125</sup>; (c)-(i) Darstellung in Analogie zur Marbostat-100-Synthese (**13a**) (s. Kap. 3.1; **Abb. 3.1** und **3.3**).



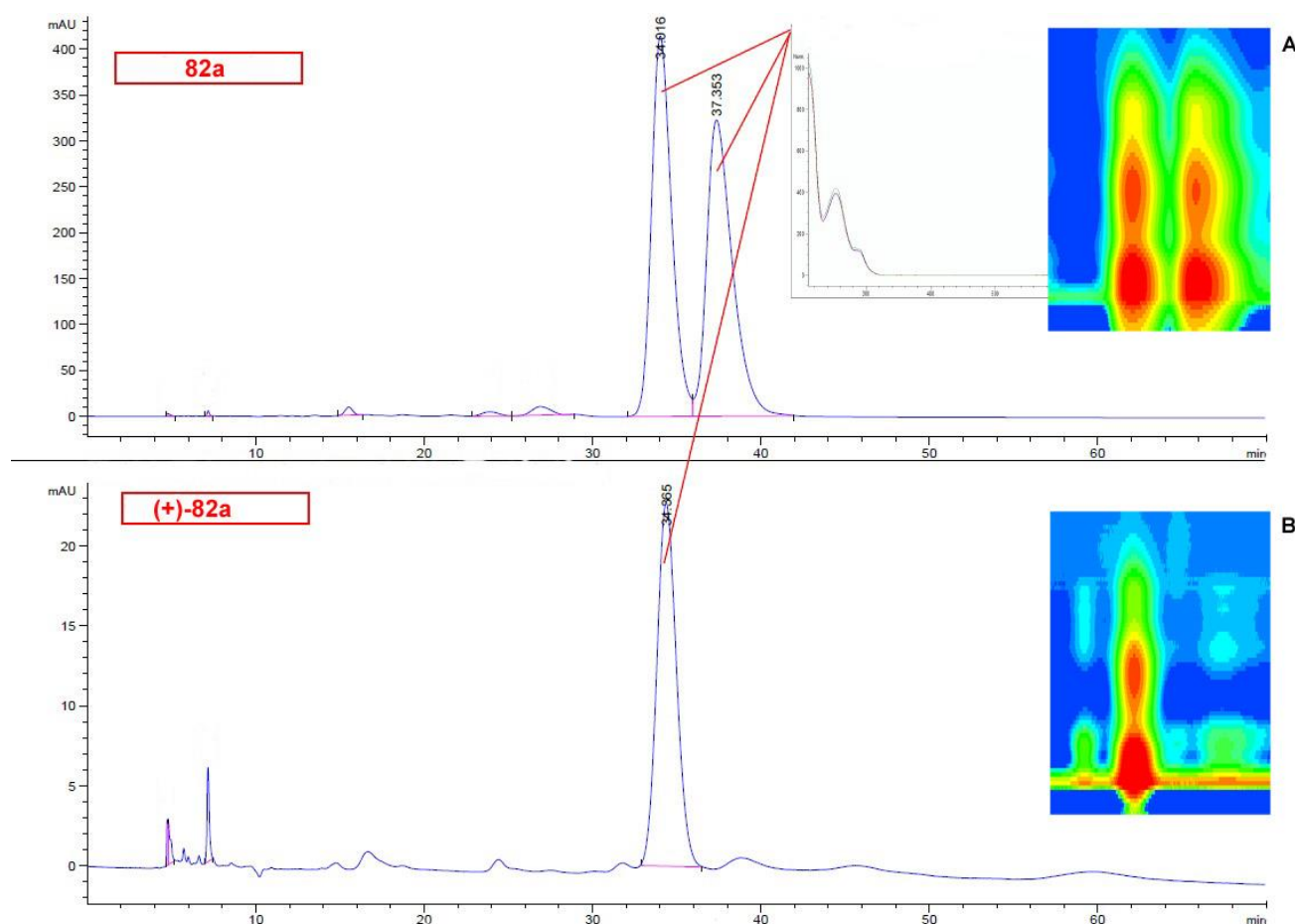
**Abb. 3.22.** Synthese von **82a** als racemische Referenzsubstanz für die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses mittels chiraler HPLC-Messung. Reagenzien und Bedingungen: (a) MeOH, 0 °C, NaBH<sub>4</sub> (0,5 eq).

Um die Syntheseroute verwirklichen zu können, kamen vier (**84**<sup>126-128</sup>, **85**<sup>128</sup>, **86**<sup>128</sup>, **87**<sup>127</sup>) Ausgangsverbindungen (s. **Abb. 3.21**) in Frage (zu ihrer Synthese s. Kap. 9.4.8), die biokatalytisch nach den entsprechenden Literaturvorschriften mit der Bäckerhefe (Typ II, Sigma Aldrich, Kat.-Nr.: YSC2) umgesetzt werden konnten. Lediglich beim  $\alpha$ -Ketoester, bei

dem der Indol-Stickstoff durch eine Phenylsulfonylgruppe **85** geschützt ist, erfolgte eine stereoselektive Reduktion des Ketons zum sekundären Alkohol (+)-**82a**.

Die geplante Syntheseroute sah ferner eine katalysierte Cyanierung des stereoselektiven  $\alpha$ -Alkohols (+)-**82** in Anlehnung an die Lit.<sup>118-121</sup> vor. Dann sollte die Nitril-Gruppe in *R*- oder *S*-**83** zu dem primären Amin *R*- oder *S*-**17a** entsprechend Lit.<sup>122-125</sup> umgesetzt werden. Die Reaktionen c-i (s. **Abb. 3.21**) sollten in Analogie zur etablierten Methode der Marbostat-100-Synthese (**13a**) durchgeführt werden (vgl. Kap. 3.1; **Abb. 3.1**, c-e und **Abb.3.3**, a-d).

Der Enantiomerenüberschuss des chiralen sekundären Alkohols (+)-**82a** wurde mit einer chiralen HPLC-Messung bestimmt (s. Kap. 9.2 und Kap. 9.4.8) und lag bei  $\geq 99\%$  ee (s. **Abb. 3.23**). Als Referenz wurde das entsprechende Racemat **82a**, zugänglich durch Reduktion von **85** mittels NaBH<sub>4</sub>, verwendet (s. **Abb. 3.22**).



**Abb. 3.23.** Chromatogramm der chiralen HPLC-Messung von **82a** (A) und (+)-**82a** (B) mit den zugehörigen UV-Spektren (rechtes Quadrat) und Isoplots.

Bei dem Signal im Chromatogramm B (s. **Abb. 3.23**) bei einer Retentionszeit von 37 min handelt es sich um eine Verunreinigung, die bei einer Gesamtausbeute von 7 % nicht vollständig abgetrennt werden konnte. Die Integration der Peakfläche zeigt ferner, dass die Konzentration dieser Verunreinigung sehr niedrig ist.

Die lange Reaktionszeit von 3,5 Wochen, die sehr geringen Ausbeute (7 %), die zeitintensive Aufarbeitung sowie die Tatsache, dass auf diesem Wege nur eines der beiden Enantiomere gewonnen werden kann, zeigten, dass dieser Ansatz zur enantioselektiven Darstellung des Marbostat-100-Derivates jedoch ungeeignet ist.

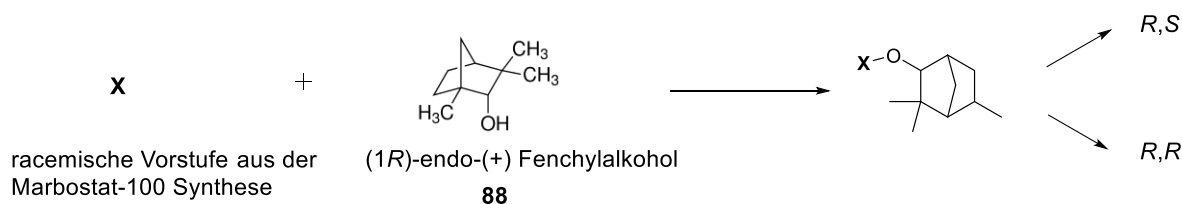
### 3.7.2 Diastereomerentrennung

Nachdem der biokatalytische Ansatz sich aus den im Kap. 3.7.1 genannten Gründen als nicht geeignet erwies, wurde im Rahmen eines Vorversuches zur Gewinnung der Enantiomere eine Racematspaltung mittels fraktionierter Kristallisation diastereomerer Salze erprobt. Trotz Vorliegens des sekundären Amins **18a** als attraktive Ausgangsbasis für die Salzbildung<sup>129-131</sup>, konnten nach vorheriger Freisetzung der Base keine zufriedenstellenden Ausbeuten bei der Kristallisation mit (–)-Di-*p*-toluoyl-*L*-Weinsäure erzielt werden.

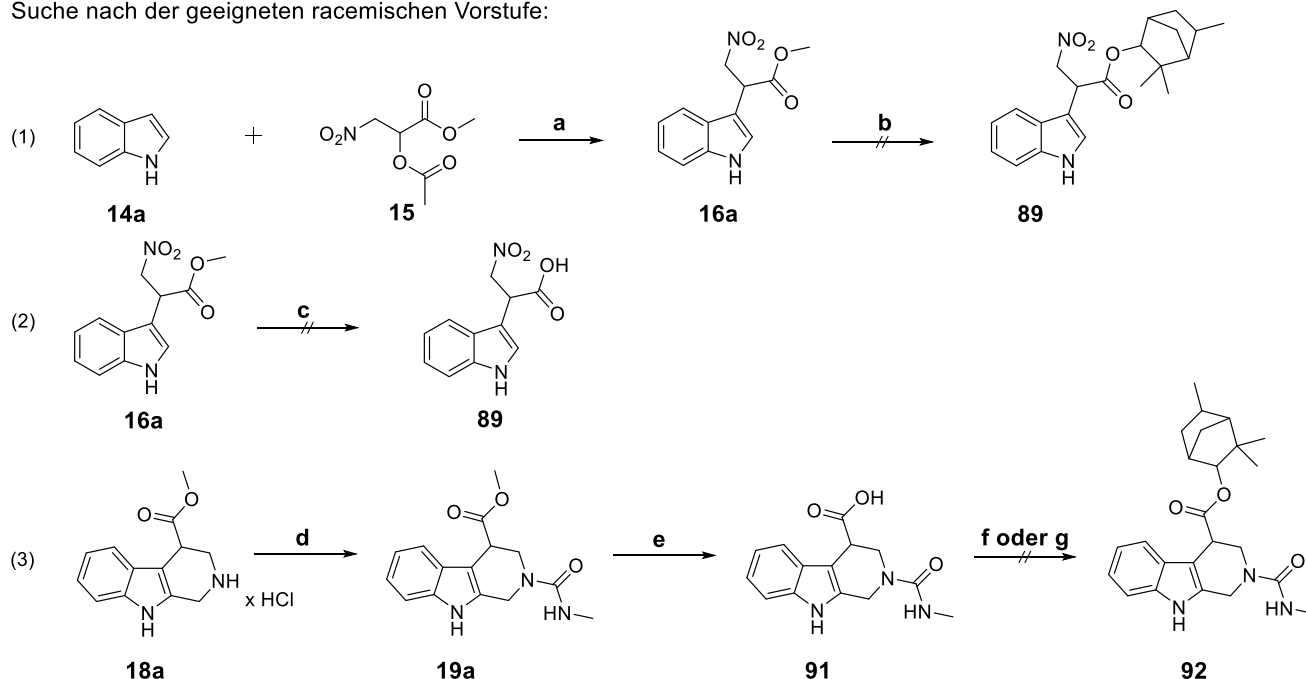
Aus diesem Grund wurde die Darstellung von *R*- und *S*-Marbostat-100 (**R-13a** und **S-13a**) über die Bildung und Trennung von Diastereomeren versucht. Um diese zu erhalten, wurden zunächst verschiedene racemische Vorstufen des Marbostat-100-Grundkörpers in Bezug auf die Möglichkeit, ein chirales Auxiliar einzufügen, untersucht.<sup>130,131</sup> Als chirales Auxiliar wurde der kommerziell zur Verfügung stehende 1*R* endo (+) Fenchylalkohol (**88**) (Carbosynth GmbH, Berkshire, England, Kat.-Nr.: FE 34598) verwendet, eine kostengünstige Variante im Vergleich zu chiralen organischen Säuren, die als Trennreagenzien eingesetzt werden können. Zudem ist aus der Literatur<sup>132</sup> bekannt, dass sich dieser chirale Alkohol zur Diastereomerentrennung eignet.

Das zu erwartende Diastereomerengemisch sollte dann chromatographisch getrennt werden. Wie in **Abb. 3.24** dargestellt, ließ sich jedoch weder **16a** noch **91** mit dem enantiomerenreinen 1*R* endo (+) Fenchylalkohol umsetzen.

geplante Syntheseroute:



Suche nach der geeigneten racemischen Vorstufe:



**Abb. 3.24.** Syntheseplanung enantiomerenreiner Derivate durch Diastereomerentrennung ausgehend von verschiedenen racemischen Vorstufen des Marbostat-100-Grundkörpers. (a) Indol (**14a**), Methyl 2-acetoxy-3-nitropropanoat (**15**, 1,2 eq),  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (basisch, 1,2 eq), 65 °C, 1,5 Std; (b) Durchführung laut Lit.<sup>133</sup>; (c) THF /  $\text{H}_2\text{O}$  (8:2), LiOH (1,2 eq), RT., 24 Std; (d) MeCN, DIPEA (3,5 eq), 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-methyl-carbamat (1,1 eq), RT., 16 Std; (e) THF /  $\text{H}_2\text{O}$  (8:2), LiOH (1,2 eq), RT., 24 Std; (f) Durchführung analog Lit.<sup>134</sup>; (g) Durchführung analog Lit.<sup>132</sup>

### 3.7.3 Asymmetrische Synthese mittels eines chiralen Katalysators

Da die beiden vorgestellten Verfahren keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferten (s. Kap. 3.7.1 und Kap. 3.7.2), sollte in weiterer Folge eine stereoselektive Synthese von Marbostat-100 (**13a**) unter Zuhilfenahme eines chiralen Katalysators<sup>135</sup> entwickelt werden.

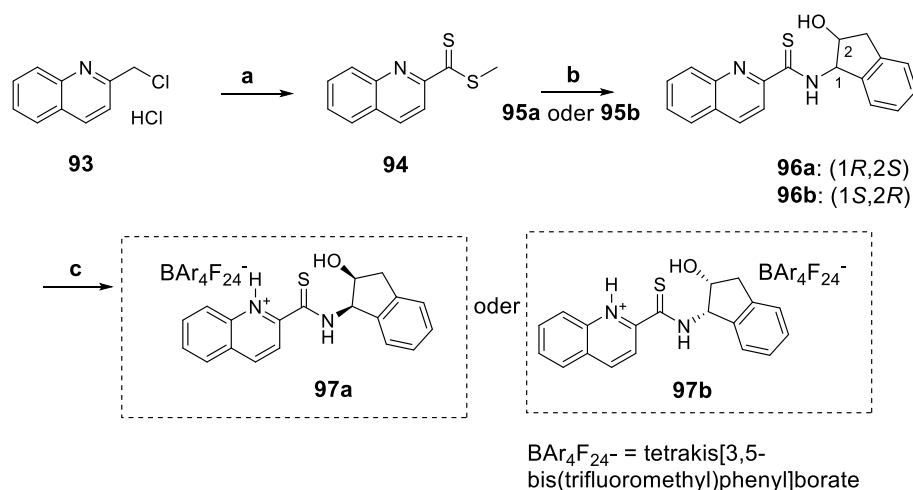
#### 3.7.3.1 Allgemeine Vorgehensweise bei den asymmetrischen Synthesen

Der Fokus der asymmetrischen Synthese lag darauf, Zielverbindungen mit möglichst großem Enantiomerenüberschuss (ee-Wert) zu synthetisieren, um die Auswirkungen auf die biologischen Untersuchungen, die das Vorhandensein des Minorenantiomers mit sich bringen könnte, möglichst gering zu halten. Im Laufe der Synthese wurde die Enantiomerenreinheit

mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Analyse durch die Zugabe eines Shift-Reagenzes (*S*)-(+)-2,2,2-Trifluor-1-(9-anthryl)ethanol **106** (Trivialname: *S*-Anthrylalkohol) zur Messprobe bestimmt (s. Kap. 3.7.4). Diese Methode wurde zur genauen Bestimmung des ee-Wertes durch zusätzliche HPLC-Messungen ergänzt. Für Reaktionsstufen, bei denen es nicht möglich war, mit dem *S*-Anthrylalkohol **106** eine Kontrolle des ee-Wertes durchzuführen, wurde dieser ausschließlich mittels HPLC bestimmt (s. Kap. 3.7.5).

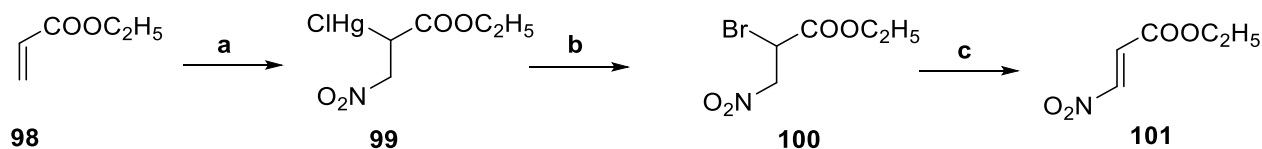
### 3.7.3.2 Asymmetrische Synthese von *R*- und *S*-Marbostat-100 (*R*-13a und *S*-13a)

Für die asymmetrische Synthese wurden zunächst die jeweiligen cis-Aminoindanol-Schwefelharnstoff Organokatalysatoren **97a** und **97b**, die für die enantioselektive Addition des (*E*)-Ethyl 3-Nitroacrylats (**101**) an Indol benötigt wurden, entsprechend der Literatur<sup>135,136</sup> synthetisiert (s. **Abb. 3.25**). Um die Vorstufen der Katalysatoren zu erhalten, wurde der Halogenmethyl-Aromat 2-(Chloromethyl)quinoline hydrochlorid (**93**) mit elementarem Schwefel in einem dipolar-aprotischen Lösungsmittel versetzt.<sup>136</sup> Durch die Zugabe von Triethylamin bilden sich die Triethylammoniumsalze der entsprechenden Dithiobenzoessäuren, welche durch Versetzen mit Iodmethan in den Dithioester **94** überführt werden.<sup>136</sup> Das Methyl-quinolin-2-carbodithioat (**94**) reagiert dann in weiterer Folge mit (1*R*,2*S*)-1-Amino-2,3-dihydro-1*H*-inden-2-ol (**95a**), beziehungsweise (1*S*,2*R*)-1-Amino-2,3-dihydro-1*H*-inden-2-ol (**95b**), wodurch es zur Bildung der Vorstufen der Katalysatoren **96a** (1*R*,2*S*) und **96b** (1*S*,2*R*) kommt.<sup>135</sup> Die Überführung in die aktiven Quinolin-Schwefelamid-Katalysatoren **97a** und **97b** erfolgt *in situ* durch die Behandlung der Pre-Katalysatoren mit Trifluormethansulfonsäure und Natrium tetrakis[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]borat als Gegenion in einer Chloroform-Lösung (s. **Abb. 3.25**).<sup>135</sup>



**Abb. 3.25.** Synthese von 2-(((1*R*,2*S*)-2-hydroxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-yl)carbamothioyl)quinolin-1-ium-tetrakis[3,5-bis(trifluormethyl)phenyl]borat (**97a**) und 2-(((1*S*,2*R*)-2-hydroxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-yl)carbamothioyl)quinolin-1-ium tetrakis[3,5-bis(trifluormethyl)phenyl]borat (**97b**). Reagenzien und Bedingungen: (a) (1) S, NEt<sub>3</sub>, DMSO, 3 Std; (2) < 15 °C, CH<sub>3</sub>I. (b) (1*R*,2*S*)-1-amino-2,3-dihydro-1*H*-inden-2-ol (**95a**), bzw. (1*S*,2*R*)-1-amino-2,3-dihydro-1*H*-inden-2-ol (**95b**), DCM, 20 °C, 16 Std; (c) (1) Ar, CHCl<sub>3</sub>, Trifluormethansulfonsäure, RT., 5 min; (2) Natrium tetrakis[3,5-bis(trifluormethyl)phenyl]borat, RT., 10 min.

Im Vergleich zum Aufbau des racemischen Marbostat-100-Grundgerüsts, wurde für die enantioselektive Synthese die Addition des Nitroacrylats **101** an das Indol über die entsprechenden zuvor *in situ* aktivierten Katalysatoren **97a** und **97b** durchgeführt (s. **Abb. 3.27**).<sup>135</sup> Das Nitroacrylat **101** war hierbei in drei Stufen, wie in **Abb. 3.26** gezeigt, zugänglich: Ausgehend von kommerziell verfügbarem Ethylacrylat **98**, erfolgte die Umsetzung zu (1-Ethoxy-3-nitro-1-oxopropan-2-yl)-Quecksilber (II) chlorid (**99**), gefolgt von einer anschließenden Bromierung zu **100** entsprechend der Lit..<sup>137</sup> Die Bildung des Nitroalkens **101** erfolgte durch eine  $\beta$ -Eliminierung unter Abspaltung von HBr mit Natriumacetat als Base.<sup>137</sup>



**Abb. 3.26.** Darstellung der Nitrovinylverbindung **101** in Anlehnung an die Lit..<sup>137</sup> Reagenzien und Bedingungen: (a) NaNO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, HgCl<sub>2</sub>, RT., 16 Std; (b) (1) H<sub>2</sub>O, Et<sub>2</sub>O, 0 °C, Br<sub>2</sub>, (2) RT., 16 Std, NaHCO<sub>3</sub>; (c) (1) Ar, Et<sub>2</sub>O, Na-acetat, 3 Std, Reflux; (2) RT., verdünnen mit Et<sub>2</sub>O.

Im Rahmen von Vorversuchen wurde für die Darstellung von **R-102** bzw. **S-102** die in der Lit.<sup>135</sup> angegebene Molmenge für die *in situ* hergestellten Katalysatoren **97a** bzw. **97b** modifiziert (s. **Tab. 3.1**):

Menge an Katalysator <b>97a</b> bzw. <b>97b</b>	Enantiomerenüberschuss (ee-Wert)
2 Mol-% (Literaturangabe <sup>135</sup> )	55 ee [%], Laut Lit. <sup>135</sup> 95 ee [%]
25 Mol-%	≥ 99 ee [%]
50 Mol-%	88 ee [%]

**Tab. 3.1.** Evaluierung der Molmenge an Katalysator.

Demnach konnten bei der Verwendung von 1,5 eq Indol **14a** und der optimierten Stöchiometrie der *in situ* hergestellten Katalysatoren **97a** bzw. **97b** (25 mol-%) der in der Lit.<sup>135</sup> für die Bildung von (*S*)-Ethyl 2-(1*H*-indol-3-yl)-3-nitropropanoat (**S-102**) beschriebene Enantiomerenüberschuss von 95 % auf ≥ 99 % gesteigert werden. Analog dazu wurde das *R*-Enantiomer **R-102** mit einer Ausbeute von 30 % und einem ee-Wert von ≥ 99 % erhalten. Die Reduktion der Nitrogruppe **R-102** und **S-102** zu den primären Aminen **R-103** und **S-103**, sowie die Pictet-Spengler-Reaktion mit Formaldehyd, die zu **R-104** und **S-104** führte, wurden analog zur Darstellung des racemischen Marbostat-100 (**13a**) durchgeführt (vgl. Kap. 3.1; **Abb. 3.1**, Reaktionen b-c).

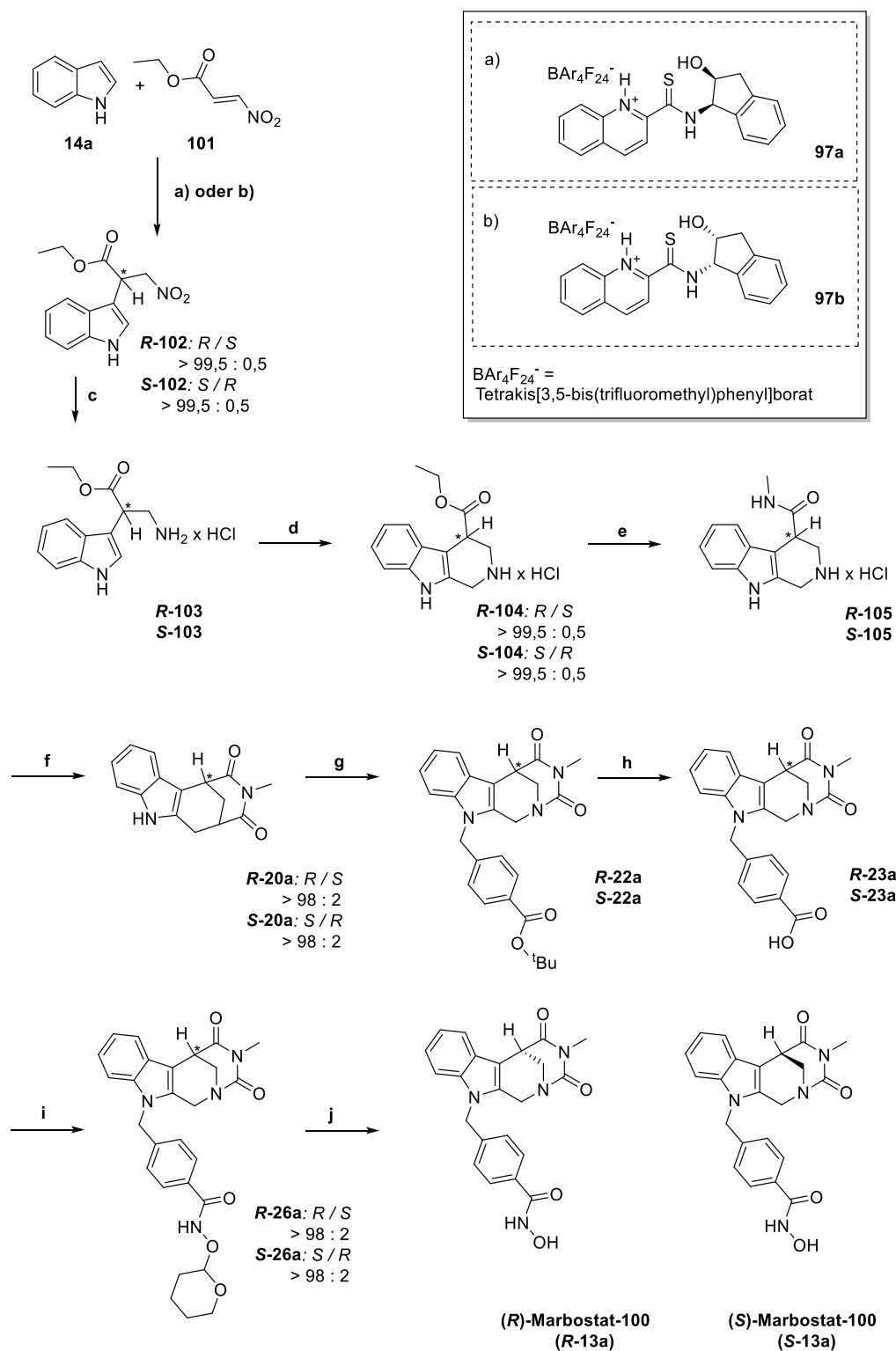
Der Aufbau des D-Ringes konnte jedoch im Gegensatz zu der racemischen Kopfgruppe von Marbostat-100 (**13a**) nicht über die Carbamat-Zwischenstufe (vgl. Kap. 3.1; **Abb. 3.1**, Reaktion d) erfolgen, da der nachfolgende Ringschluss unter stark basischen Bedingungen abläuft und somit Racemisierung eintritt. Daher mussten für die enantioselektive Synthese der Hydantoin-Partialstruktur (D-Ring) zunächst die Ethylester **R-104** und **S-104** durch Aminolyse unter milden Reaktionsbedingungen in die entsprechenden Amide **R-105** und **S-105** umgewandelt werden, bevor die Cyclisierung des D-Ringes erfolgen konnte.

Aus der Lit.<sup>138,139</sup> ist jedoch bekannt, dass bei nicht-katalysierten Aminolysen von Estern, die keine guten Abgangsgruppen beinhalten, hohe Temperaturen (> 200 °C) benötigt werden, um die eher träge ablaufende Reaktionsgeschwindigkeit zu steigern.<sup>138</sup> Da dieser Vorgang die Racemisierung begünstigen würde, wurde nach einem effizienten und milden Katalysator gesucht.<sup>138</sup>

Dabei fiel die Wahl auf Natriumcyanid, welches als starkes Nucleophil mit niedriger Basizität über die Bildung des reaktiven Acylcyanides als Intermediat die Aminolyse begünstigt.<sup>138</sup> Im Unterschied zur Lit.<sup>138</sup> (50 °C) wurde zugunsten der Enantioselektivität die Aminolyse zu den Carbonsäureamiden **R-105** und **S-105** bei 0 °C durchgeführt und die daraus resultierende verlängerte Reaktionszeit toleriert. Im nächsten Schritt konnte dann die Bildung der Hydantoin-Partialstruktur (D-Ring) **R-20a** und **S-20a** mit Triphosgen als O=C-Komponente und Pyridin als Base in Analogie zur Lit.<sup>140</sup> unter Modifikation der Reaktionszeit

(s. Kap. 9.4.10) hergestellt werden. Die Alkylierung der Kopfgruppe erfolgte nach der bereits beschriebenen milden Methode mit  $K_2CO_3$  (vgl. Kap. 3.1; **Abb. 3.4**, Reaktion d) und führte zu **R-22a** und **S-22a**. Die Spaltung der *tert*-Butylester **R-23a** und **S-23a** sowie die Amidierung mit  $NH_2OTHP$  zu **R-26a** und **S-26a** wurden analog zur Darstellung des racemischen Marbostat-100 (**13a**) durchgeführt (vgl. Kap. 3.1; **Abb. 3.3**; s. **Abb. 3.27**, Reaktionen h-i). Die Freisetzung der Hydroxamsäuren **R-13a** und **S-13a** erfolgte im Gegensatz zum racemischen Marbostat-100 (**13a**) mit Amberlyst 15. Dieser kommerziell verfügbare Ionenaustauscher ist, wie auch Pal *et al.*<sup>141</sup> zeigten konnten, für die saure Spaltung von Acetalen geeignet, führt bei Raumtemperatur zu guten Ausbeuten und ist nach Reaktionsende wieder leicht zu entfernen.





**Abb. 3.27.** Enantioselektive Synthese von *R*- und *S*-Marbostat-100 (**R-13a** und **S-13b**). Reagenzien und Bedingungen: (a) 2-(((1*R*,2*S*)-2-Hydroxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-yl)carbamothioyl)quinolin-1-ium tetrakis(3,5-bis(trifluormethyl)phenyl)borat (**97a**), CHCl<sub>3</sub>, -60 °C, 16 Std; (b) 2-(((1*S*,2*R*)-2-Hydroxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-yl)carbamothioyl)quinolin-1-ium tetrakis(3,5-bis(trifluormethyl)phenyl)borat (**97b**), CHCl<sub>3</sub>, -60 °C, 16 Std; (c) MeOH, THF, Zn (2 eq), 36 % HCl<sub>(aq)</sub>; (d) 36 % Formaldehyd (1,2 eq), MeOH, RT., 24 Std; (e) CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, NaCN (kat), MeOH, 0 °C, 5 Tage. (f) Triphosgen, Pyridin, DCM, 0 °C, 3 Std; (g) *tert*-Butyl 4-(brommethyl)benzoat (**21**, 1,2 eq), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2-Butanon, 80 °C, 16 Std; (h) DCM, TFA, RT.; (i) NH<sub>2</sub>OTHP (**25**, 4 eq), BOP (**24**, 1,2 eq), DIPEA (3,5 eq), THF, RT., 2 Std; (j) MeOH / THF (1:1), Amberlyst 15 (kat.), RT., 24 Std.

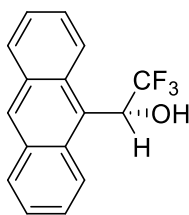
### 3.7.4 Bestimmung der Enantiomerenreinheit mittels *S*-Anthrylalkohol **106**

#### 3.7.4.1 Theoretische Grundlagen

Das  $^1\text{H}$ -NMR stellt eine Technik dar, die es ermöglicht, zwischen Diastereomeren und Enantiomeren zu unterscheiden, da die Existenz von Chiralitätszentren die Lage und Form von NMR-Signalen beeinflussen kann.<sup>142</sup> Im Fall von Enantiomeren ist das NMR-Spektrum der beiden Enantiomere jedoch nicht unterscheidbar, da bei der Verwendung der üblichen deuterierten Lösungsmittel keine chirale Umgebung geschaffen wird.<sup>142</sup>

Es existieren verschiedene Methoden, mit deren Hilfe eine chirale Umgebung geschaffen werden kann, um die Unterscheidbarkeit von Enantiomeren im NMR-Spektrum zu ermöglichen.<sup>142</sup> Im Zuge dieser Arbeit, wie bereits im Kap. 3.7.3.1 beschrieben, wurde die Methode der Zugabe von *S*-Anthrylalkohol **106**, einem chiralen Solvatierungsagens (CSA) gewählt.<sup>142</sup> Das Hydroxyl-Proton des *S*-Anthrylalkohols **106** (s. **Abb. 3.28**) ist hierbei in der Lage, Wasserstoffbrücken-Bindungen zu den funktionellen Gruppen bestimmter Testverbindung zu bilden.<sup>142</sup> Die aromatischen Ringe ihrerseits können den Komplex durch hydrophobe Interaktionen verstärken und zudem zur Abschirmung bzw. Entschirmung der Protonen der Testverbindungen beitragen.<sup>142</sup> Diese äußeren Einflüsse der chemischen Umgebung ermöglichen es, eine Differenzierung zwischen dem *S*- und *R*-Enantiomer vorzunehmen, da die Anzahl an Protonen, die zusätzlich ab- oder entschirmt werden, zwischen den beiden Enantiomeren variiert.<sup>142</sup> Da die Bestimmung der Enantiomerenreinheit mittels *S*-Anthrylalkohol **106** auf der Erzeugung von kurzlebigen diastereomeren Solvaten beruht, die sich in ihren NMR-Spektren unterscheiden, wird für diese Methode kein externer Standard benötigt.<sup>143</sup>

Diese Methode bringt jedoch auch Einschränkungen mit sich, da die Wasserstoffbrücken-Bindungen des CSA mit großen Zielmolekülen nur dann stark genug sind, wenn sehr lipophile Lösungsmittel vorliegen und dadurch eine weniger starke Solvatisierung gegeben ist.<sup>142</sup> Demnach ist diese Methode beschränkt auf Testverbindungen, die löslich in Chloroform oder ähnlichen lipophilen Lösungsmitteln sind.<sup>142</sup> Daher konnte nicht für alle Reaktionsstufen im Laufe der chiralen asymmetrischen Synthese die Enantiomerenreinheiten mittels *S*-Anthrylalkohols **106** vermessen werden.



**106**

**Abb. 3.28.** Struktur des Shift-Reagenzes *S*-Anthrylalkohol, *S*-(+)-2,2,2-Trifluor-1-(9-anthryl)ethanol (**106**).

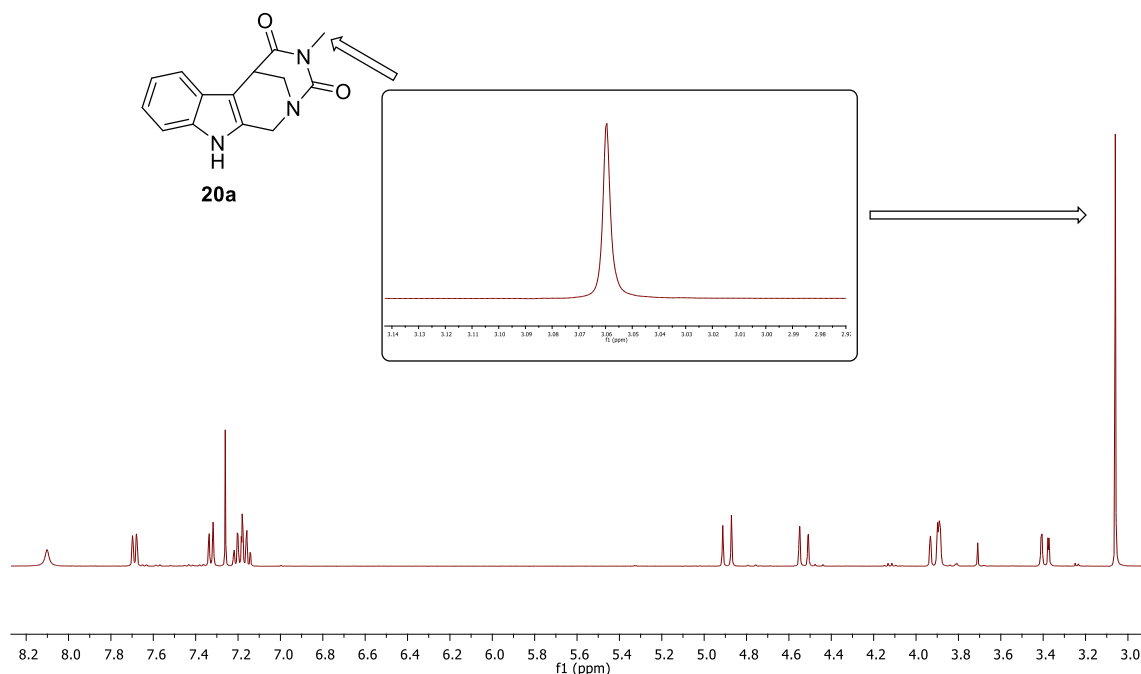
Da ein Zusammenhang zwischen den physikalischen Eigenschaften und den NMR-Eigenschaften einer Testverbindung besteht, sind enantiotope Kerne (sie haben spiegelbildliche Umgebung) aufgrund identischer physikalischer Eigenschaften isochron.<sup>143,144</sup> Daher kann eine Differenzierung der Signale erst dann erfolgen, wenn aus den Enantiomeren diastereomere Komplexe gebildet werden, wodurch diastereotope Kerne (verschiedene stereochemische Umgebung) entstehen, die aufgrund von unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften anisochron sind.<sup>143,144</sup> Durch den Zusatz eines zwei- bis vierfachen molaren Überschusses des chiralen *S*-Anthrylalkohols **106** zur Probe (Racemat bzw. Enantiomer) werden die gewünschten diastereomeren Aggregate gebildet, wodurch es zur Aufspaltung der sonst identischen Signale kommt.<sup>142,144</sup> Durch die Bestimmung des relativen Verhältnisses der diastereotopen Signalpaare (zueinander mittels Integration), kann auf das Verhältnis der beiden Enantiomere geschlossen werden.<sup>144</sup>

#### 3.7.4.2 Bestimmung der Enantiomerenreinheit am Beispiel von **20a**, *R*-**20a** und *S*-**20a**

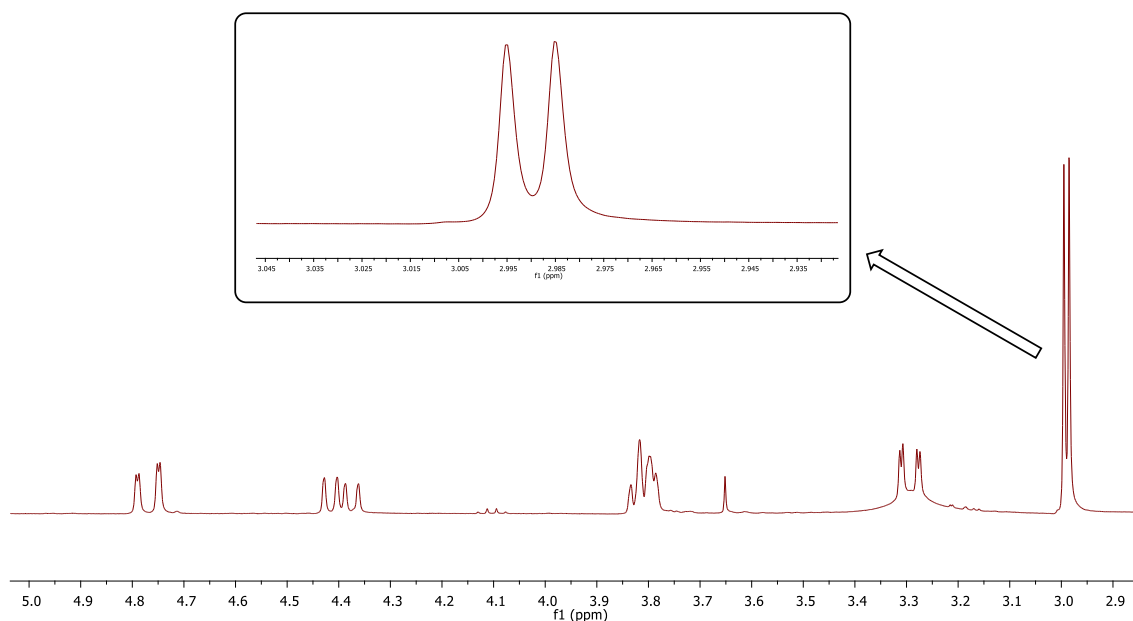
Um zu ermitteln, welches Signal sich aufgrund seiner Aufspaltung in Anwesenheit von *S*-Anthrylalkohol **106** für die Analyse der Enantiomerenreinheit eignet, wurde zunächst eine Probe der racemischen Kopfgruppe von Marbostat-100 (**20a**) mit dem zweifachen molaren Überschuss des Shift-Reagenzes versetzt. Es zeigte sich im Spektrum, dass die Methylgruppe (N-CH<sub>3</sub>) an der Hydantoin-Partialstruktur sich zur genaueren Analyse eignet, da es hier einerseits zu einer Signalaufspaltung kommt und andererseits an dieser Position keine Überlagerung zwischen Proben- und Anthrylalkohl-Signalen vorliegt. Wenn gleich keine vollständige Grundlinien-Trennung gegeben ist, konnte mit guter Näherung eine Integration der Signale durchgeführt werden (s. **Abb. 3.30**).

Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der racemischen Kopfgruppe von Marbostat-100 (**20a**) in CDCl<sub>3</sub> zeigt, dass die Methylgruppe (N-CH<sub>3</sub>) als ein Singulett bei 3,06 ppm vorliegt (s. **Abb. 3.29**).

Durch den Zusatz eines zweifach molaren Überschusses des *S*-Anthrylalkohols **106** spaltet die Methylgruppe zu einem Dublett auf (s. **Abb. 3.30**).



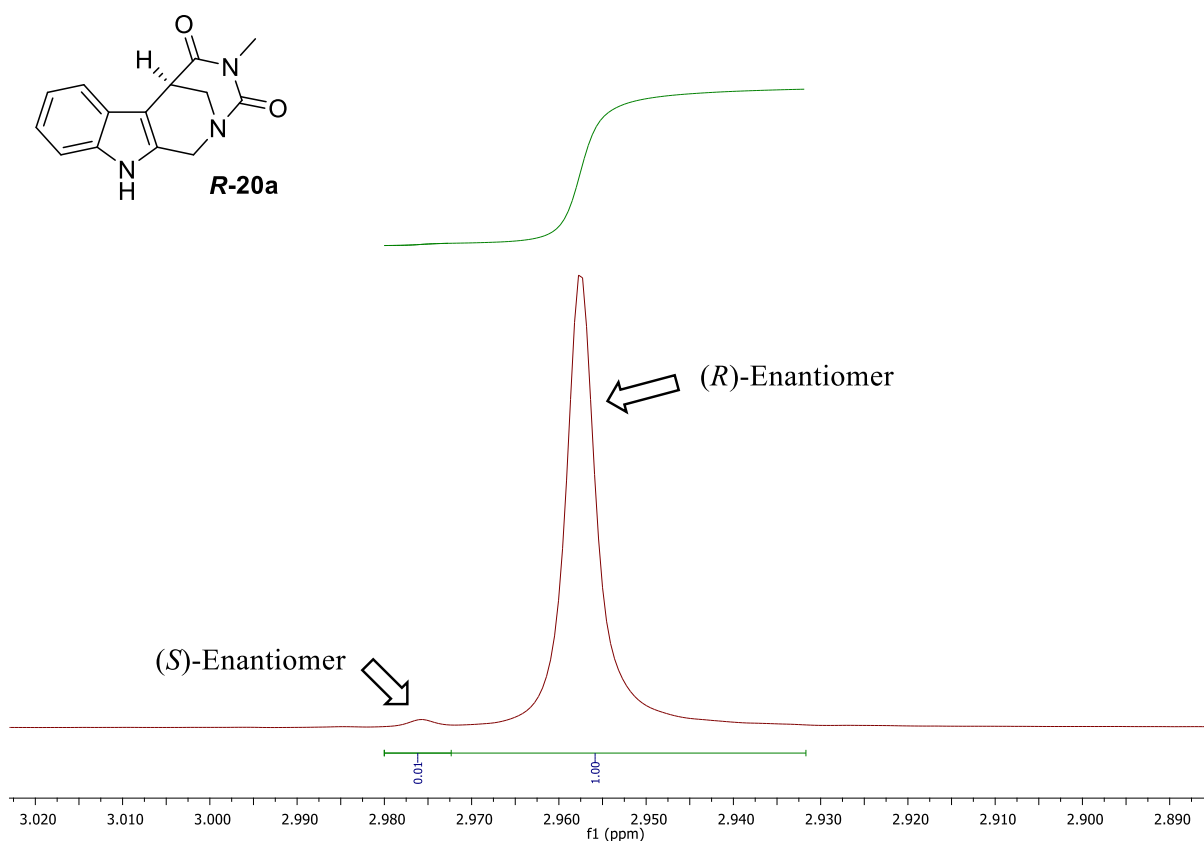
**Abb. 3.29.**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der racemischen Kopfgruppe von Marbostat-100 (**20a**) in  $\text{CDCl}_3$ .



**Abb. 3.30.**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der racemischen Kopfgruppe von Marbostat-100 (**20a**) in  $\text{CDCl}_3$  unter Zusatz eines zweifachen molaren Überschusses des *S*-Anthrylalkohols (**106**). Hierbei wird nur ein Ausschnitt des aliphatischen Bereiches gezeigt, da es im aromatischen Bereich zu Signal-Überlagerungen zwischen Probe und Shift-Reagenz **106** kommt.

Die chemischen Verschiebungen der Protonen der Methylgruppe, bedingt durch den zweifachen molaren Überschuss des *S*-Anthrylalkohols **106**, liegen für das *R*-Enantiomer (**R-20a**) bei  $\delta = 2,958$  ppm und bei  $\delta = 2,977$  ppm für das *S*-Enantiomer (**S-20a**).

In den Spektren der Enantiomere konnten die Signale des jeweiligen Minorenantiomers in der Vergrößerung detektiert werden. Sie machen eine integrale Intensität von jeweils 1 %, bezogen auf die Gesamtfläche des Signals aus (s. **Abb. 3.31**). Daraus lässt sich der Enantiomerenüberschuss für die Enantiomere **R-20a** und **S-20a** mit  $ee \geq 98$  % angeben. Eine Grundlinien-Trennung konnte auch nach weiterer Zugabe des Shift-Reagenzes nicht erreicht werden. Die mittels *S*-Anthrylalkohol **106** erhaltenen  $ee$ -Werte wurden zusätzlich durch eine chirale HPLC-Messung verifiziert, sofern eine Auftrennung der beiden Signale der Enantiomere möglich war.



**Abb. 3.31.** Exemplarischer Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 24,95 °C) von **R-20a** bei Zusatz eines zweifachen molaren Überschusses an *S*-Anthrylalkohol **106**.

### 3.7.5 Bestimmung der Enantiomerenreinheit mittels chiraler HPLC-Messung

Um bei möglichst vielen Reaktionsstufen die Enantiomerenreinheit bestimmen zu können, wurde, wie bereits in Kap. 3.7.3.1 erwähnt, die Bestimmung der Enantiomerenreinheit mittels chiraler HPLC-Messung als zusätzliche bzw. ergänzende Methode zum Shift-Reagenz **106** gewählt.

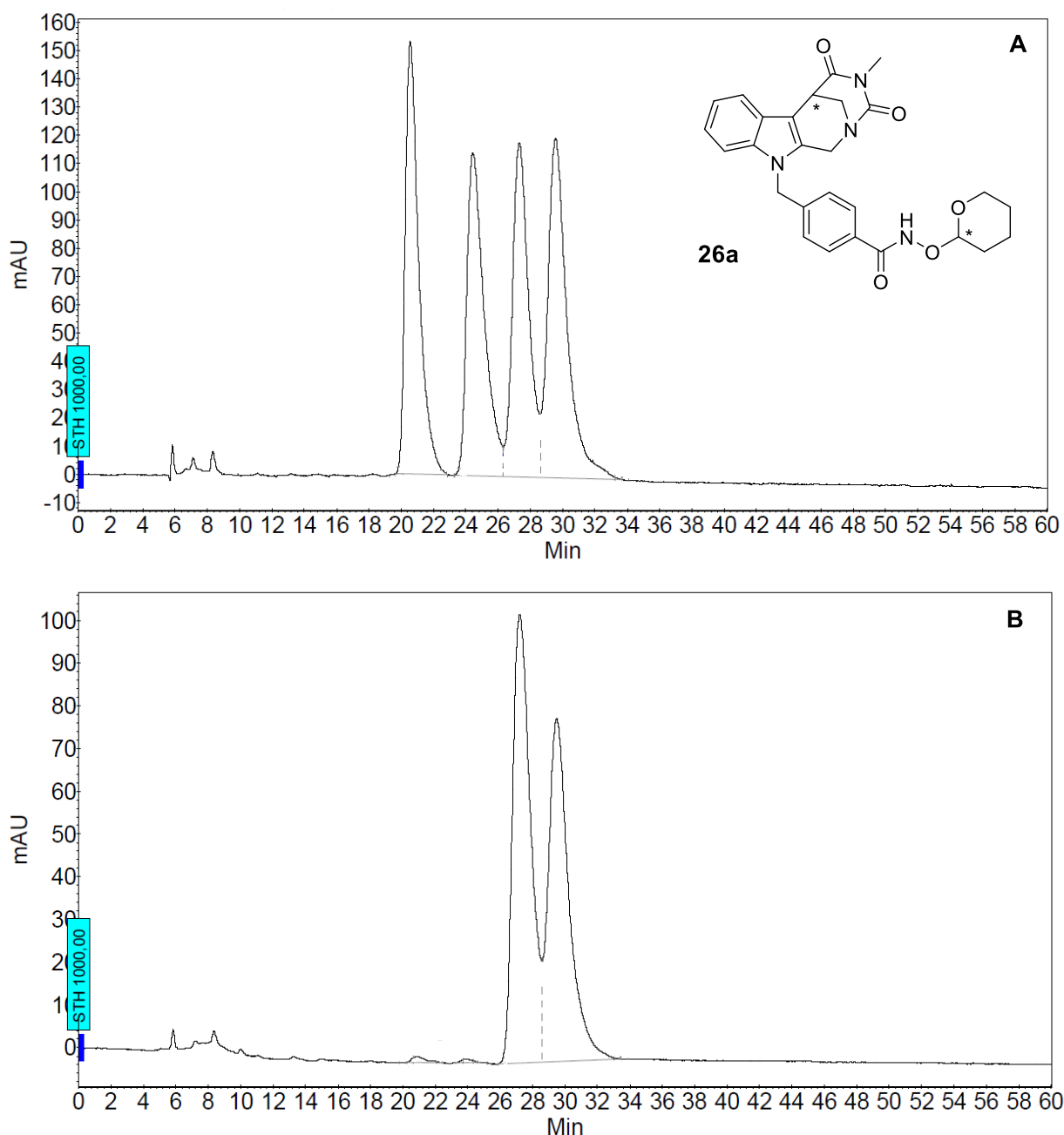
Für die Evaluierung einer Trennmethode für die Enantiomere wurde zunächst eine HPLC-Messung anhand des Racemates durchgeführt. Aufgrund der vorgenommenen Modifikationen bei den Synthesen des racemischen Marbostat-100 (**13a**) und der Enantiomeren wurden für die entsprechend abweichenden Reaktionszwischenstufen die racemischen Ausgangsverbindungen nachsynthetisiert. Dabei erfolgte die Darstellung in Analogie zur entsprechenden Enantiomer-Synthese. Dies gilt gleichermaßen für die Bestimmung mittels *S*-Anthrylalkohol **106**.

Zur Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse wurden als chirale stationäre Phasen Chiracel OD<sup>®</sup>, Daicel OD<sup>®</sup> und Lux Cellulose<sup>®</sup> gepackte Säulen gewählt (s. Kap. 9.2).

Für die synthetisierten chiralen Endverbindungen konnte auch nach intensiver Variation der HPLC-Einstellungen, wie z. B. die Wahl der Eluenten bzw. Eluentenverhältnisse, Druckeinstellungen, Injektionsvolumina etc., keine geeignete HPLC-Methode entwickelt werden. Um jedoch eine Aussage darüber zu erhalten, ob der zuvor ermittelte ee-Wert auch bis zum Ende der Reaktionskaskade erhalten bleibt, wurden an Stelle der Endverbindungen die THP-Vorstufen zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit herangezogen. Diese Vorgehensweise ist gerechtfertigt, da bereits in vorhergehenden Synthesestufen gezeigt werden konnte, dass der Einsatz von HCl oder sogar noch saureren Bedingungen, wie bei der Verwendung von TFA, keinen Einfluss auf den ee-Wert hatte.

Die THP-Vorstufe eignet sich gut zur HPLC-Messung, da durch den Einbau der Acetal-Schutzgruppe das Racemat ein Gemisch aus vier Diastereomeren darstellt (*R*, *S*; *S*, *R*; *R*,*R* und *S*,*S*), weswegen bei der Messung der racemischen Verbindung **26a** vier Signale erscheinen (s. **Abb. 3.32**, A). Die jeweils zusammengehörigen Signale konnten mit Hilfe der UV-Spektren ermittelt werden. Die auf diese Weise entstandenen Diastereomere weisen physikalische und chemische Unterschiede in ihren Eigenschaften auf, weswegen eine Trennung durch Interaktion mit den chiralen Säulen möglich war. Durch die asymmetrische Synthese wird dem Chiralitätszentrum in der Kopfgruppe (C-6) eine definierte Ausrichtung gegeben, wodurch bei der Vermessung der Enantiomere die beiden zusammengehörigen

Signale angereichert werden (s. **Abb. 3.32**, B). Durch die Bestimmung des relativen Verhältnisses der diasterotopen Signalpaare (Integration) zueinander, konnte auf das Verhältnis der beiden Enantiomere geschlossen werden (s. Tab. 3.2).<sup>144</sup>



**Abb. 3.32.** Darstellung einer chiralen HPLC-Messung zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit am Beispiel von *R*-26a. (A) zeigt die racemische Verbindung (**26a**), die aufgrund der Acetal-Schutzgruppe als Diastereomer vorliegt. (B) zeigt die Anreicherung des *R*-Marbostat-100 (*R*-26a) aufgrund der definierten Ausrichtung am Chiralitätszentrum in der Kopfgruppe.

racemisches Gemisch ( <b>26a</b> )	Zeit [min]	Fläche [%] gerundete Werte	Enantiomer ( <b>R-26a</b> )	Zeit [min]	Fläche [%] gerundete Werte
Signal 1	20,56	24,91	Signal 1	20,85	0,54
Signal 2	24,46	23,93	Signal 2	23,90	0,24
Signal 3	27,33	23,18	Signal 3	27,20	52,82
Signal 4	29,55	27,97	Signal 4	29,49	46,40

**Tab. 3.2.** Darstellung der Retentionszeiten [min] sowie der entsprechenden Peakflächen [%] bei den chiralen HPLC-Messungen von A und B (siehe **Abb. 3.32.**).

### 3.7.6 Ermittlung der absoluten Konfiguration mittels Röntgenstrukturanalyse

Die Möglichkeit, die absolute Konfiguration chiraler Verbindungen mittels Röntgenstrukturanalyse zu ermitteln, wurde 1951 erstmals von Bijvoet *et al.*<sup>145</sup> demonstriert.<sup>146</sup>

Dies stellt ein Verfahren dar, bei dem ein Kristall mit Röntgenstrahlung bestrahlt wird, wodurch unterschiedliche Beugungsbilder am Kristallgitter entstehen, die es erlauben, den atomaren Aufbau zu bestimmen.<sup>146-148</sup> Voraussetzung für die Durchführung der Röntgenstrukturanalyse ist die Züchtung eines ausreichend großen Kristalls.<sup>149</sup>

Zur Aufklärung der absoluten Konfiguration der Stereozentren des *R*- und *S*-Marbostat-100 (**R-13a** und **S-13a**) wurden zwei Methoden gewählt:

Die erste Methode (Methode A) bestand darin, diastereomere Salze aus der freien Base von **R-104** und (–)-Di-*p*-toluoyl-*L*-Weinsäure ((–)-**107**) zu bilden.<sup>150</sup> Der Grundgedanke hinter dieser Methode ist, dass basische Gruppen in Verbindungen, deren absolute Stereochemie bestimmt werden sollen, dazu genutzt werden, mit chiralen Gegenionen diastereomere Salze zu bilden.<sup>149</sup> Das dadurch entstandene Molekül weist mehrere Chiralitätszentren auf, wodurch zunächst die relative Konfiguration (Verhalten der einzelnen Zentren zueinander) ermittelt werden kann.<sup>149</sup> Weil bei dieser Vorgehensweise keine vom Chiralitätszentrum ausgehenden Bindungen gebrochen werden und bei der Wahl des Gegenions eine Verbindung gewählt wurde, von der die Stereochemie bekannt ist, konnte **R-104** in Beziehung zur Vergleichssubstanz (–)-Di-*p*-toluoyl-*L*-Weinsäure ((–)-**107**) gesetzt und damit die absolute Konfiguration bestimmt werden.<sup>149</sup>

Dafür wurde **R-104** in Methanol gelöst und mit einer methanolischen Lösung des Salzbildners (–)-Di-*p*-toluoyl-*L*-Weinsäure ((–)-**107**) im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 vereinigt. Die durch langsames Abdampfen des Lösungsmittels gewonnenen Kristalle konnten mittels



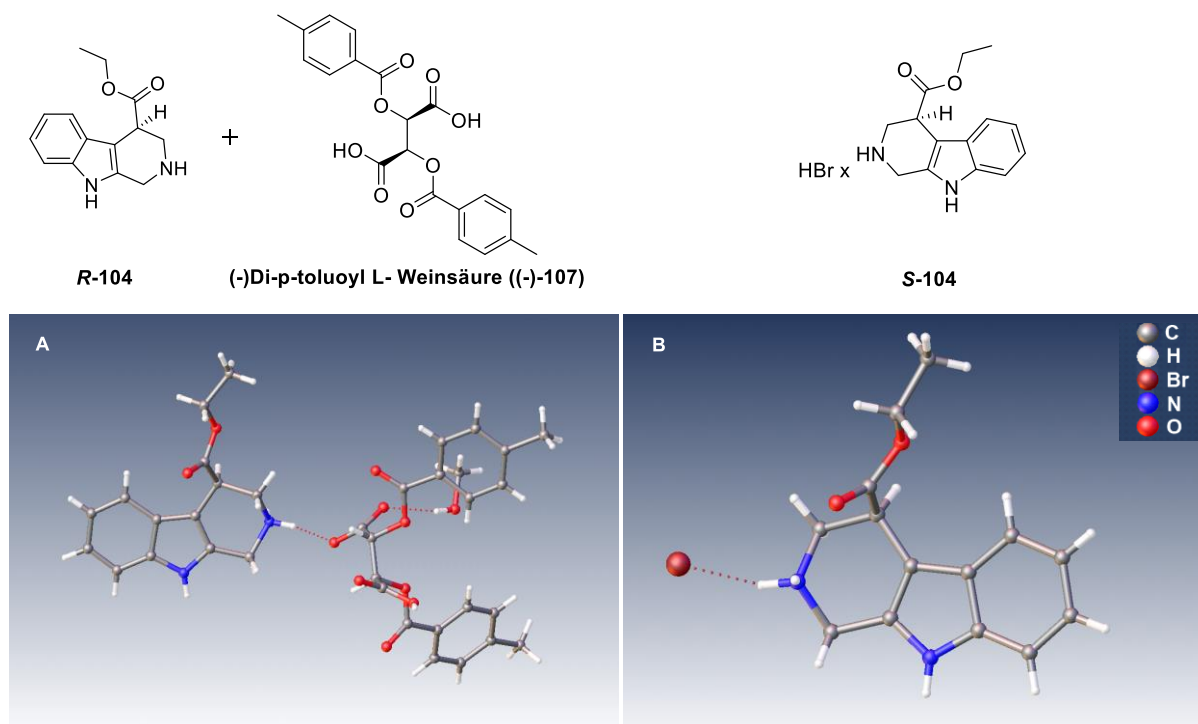
Röntgenstrukturanalyse vermessen werden. Dabei handelte es sich hier um das *R*-Enantiomer (s. **Abb. 3.33**, A).

Zur Absicherung wurde überprüft, ob es sich bei **S-104** demnach tatsächlich um das *S*-Enantiomer handelt. Folglich wurde eine diastereomere Salzbildung mit (+)-*Di-p*-toluoyl-*D*-Weinsäure ((+)-**107**) nach der für das *R*-Enantiomer geschilderten Vorgehensweise vorgenommen. Hierbei konnten jedoch keine geeigneten Kristalle gezüchtet werden, woraufhin die zweite Methode (Methode B) zum Einsatz kam.

Die bei der Röntgenstrukturanalyse gemessenen Beugungsbilder weisen grundsätzlich ein Inversionszentrum auf.<sup>151</sup> Chirale Strukturen besitzen kein Inversionszentrum.<sup>151,152</sup> Damit liegt die Information über die Chiralität im Unterschied der eigentlich sonst inversionssymmetrischen und damit gleichen Reflexe.<sup>148,151,152</sup> Inwiefern dieser Unterschied signifikant ist, hängt vom Beitrag der anomalen Dispersion (Brechungsindex fällt mit steigender Frequenz) ab, die selbst einen Beitrag zu den Atomformfaktoren darstellt.<sup>147,152</sup> Der Atomformfaktor beschreibt das Streuvermögen einer Atomsorte bei einfallender Röntgenstrahlung.<sup>147</sup> Während bei leichten Atomen ein signifikanter Unterschied nicht immer garantiert ist, ist der Beitrag bei den schweren Elementen (ab der 3. Periode) so groß, dass eine absolute Bestimmung der Konfiguration möglich ist.<sup>147,148,151,152</sup>

Aus diesem Grund wurde nach Freisetzung der Base **S-104** in Methanol / Ethylacetat (1:1) gelöst und im Exsikkator für zwei Tage Bromwasserstoff-Gas ausgesetzt. Nach dem Verdampfen der Lösungsmittel Methanol und Ethylacetat lassen sich Kristalle in Form von Hydrobromid-Salzen erhalten. Die röntgenkristallographische Messung dieser Salze konnte bestätigen, dass es sich bei **S-104** um das entsprechende *S*-Enantiomer handelt (s. **Abb. 3.33**, B). Die Bestimmung der absoluten Konfiguration über den Einbau eines Schweratoms mittels Bromwasserstoff wird in der Literatur<sup>146,147,153</sup> beschrieben.

Die Züchtung von Kristallen für die Aufklärung der absoluten Stereochemie wurde für alle chiralen Verbindungen nach Methode A oder B vorgenommen.

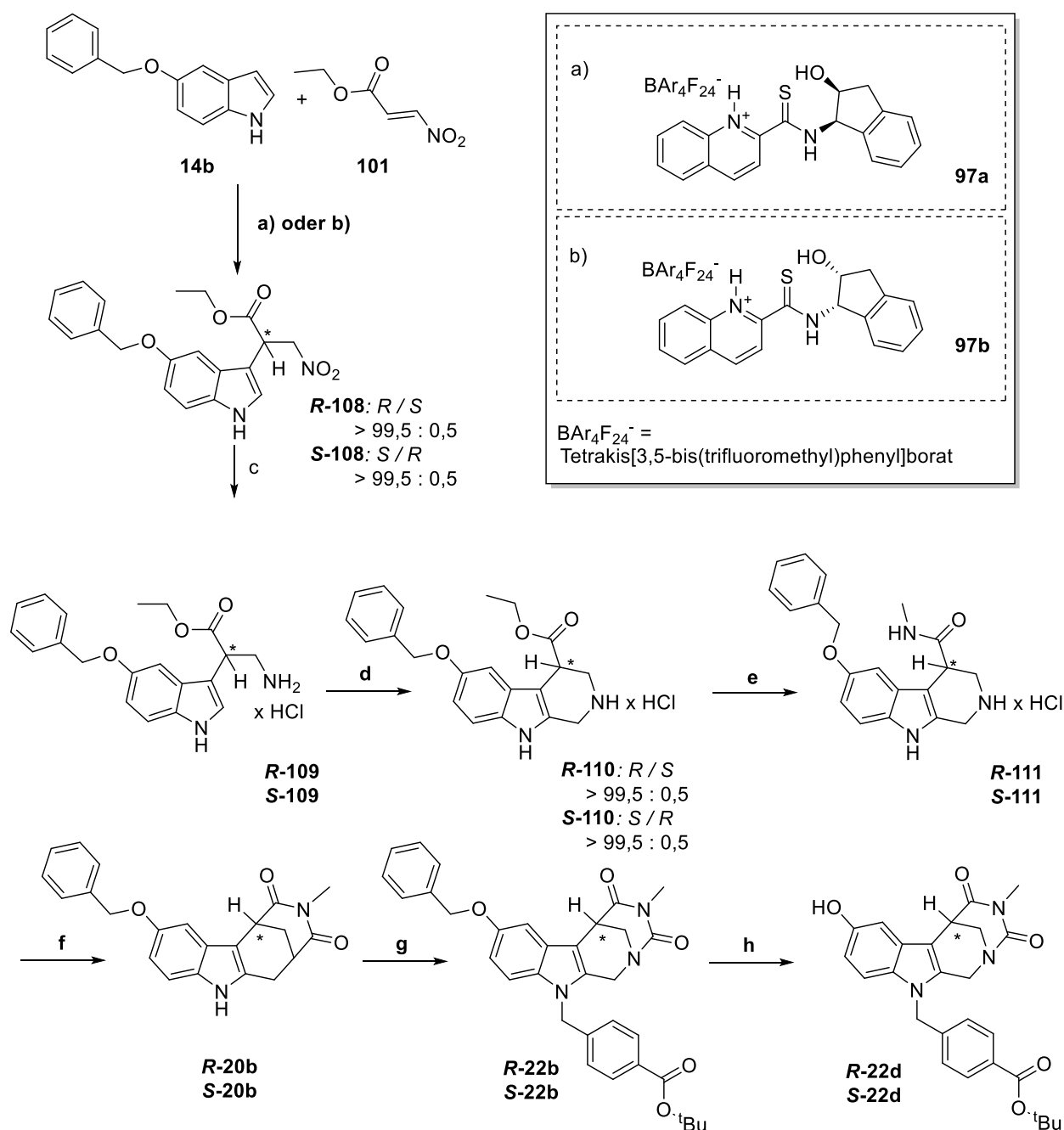


**Abb. 3.33.** Röntgenkristallstrukturen von *R*- und *S*-Marbostat-100 (**R-13a** und **S-13a**). (A) zeigt *R*-Ethyl-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat (**R-104**), welches mit (-)-Di-*p*-toluoyl-*L*-Weinsäure aus MeOH kristallisiert wurde. (B) zeigt *S*-Ethyl 2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat (**S-104**) als Hydrobromid-Salz. Die Legende bei (B) erläutert die Farbgebung für die einzelnen Atome. Die Messung und Berechnung der Röntgenstrukturdaten erfolgte durch die Abteilung für Röntgenstrukturanalyse der Universität Regensburg an der Fakultät Chemie und Pharmazie.

### 3.7.7 Asymmetrische Synthese der wasserlöslichen Verbindung 13h

Zusätzlich zur Leitverbindung Marbostat-100 (**13a**) sollte auch das racemische **13h** einer asymmetrischen Synthese unterzogen werden. Die Wahl fiel auf dieses Derivat, da **13h** bei den pharmakologischen Untersuchungen eine zu Marbostat-100 (**13a**) vergleichbare inhibitorische Aktivität gegenüber HDAC6 aufweist bei gleichzeitig verbessertem Löslichkeitsverhalten in H<sub>2</sub>O.

Da im Rahmen der Synthese von *R*- und *S*-Marbostat-100 (**R-13a** und **S-13a**) keine Racemisierung am CH-aziden Chiralitätszentrum erfolgte, wurde die Syntheseroute zur Darstellung der beiden Enantiomere des racemischen wasserlöslichen Derivates **13h** (vgl. Kap. 3.7.3.2; **Abb. 3.27**) grundsätzlich beibehalten. Teilweise mussten jedoch Modifikationen der asymmetrischen Synthese von Marbostat-100 (**R-13a** und **S-13a**) vorgenommen werden, da sich durch den lipophilen Benzyloxy-Substituenten Veränderungen in der Löslichkeit ergaben.



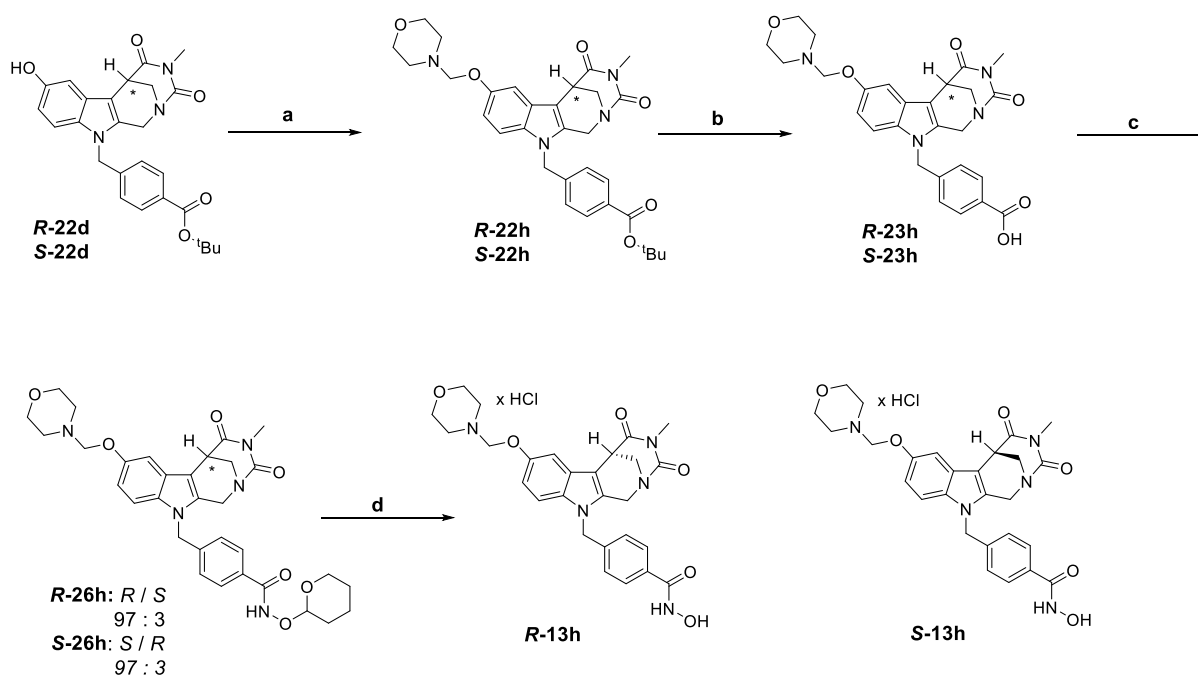
**Abb. 3.34.** Enantioselective Synthese von *tert*-Butyl 4-(((6*R*)-8-hydroxy-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoat (**R-22d**) und *tert*-Butyl 4-(((6*S*)-8-hydroxy-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoat (**S-22d**). Reagenzien und Bedingungen: (a) 2-(((1*R*,2*S*)-2-Hydroxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-yl)carbamothioyl)quinolin-1-ium tetrakis[3,5-bis(trifluormethyl)phenyl]borat (**97a**), CHCl<sub>3</sub>, -60 °C, 16 Std; (b) 2-(((1*S*,2*R*)-2-Hydroxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-yl)carbamothioyl)quinolin-1-ium tetrakis[3,5-bis(trifluormethyl)phenyl]borat (**97b**), CHCl<sub>3</sub>, -60 °C, 16 Std; (c) MeOH, THF, Zn (2 eq), HCl<sub>(aq)</sub>; (d) 36 % Formaldehyd (1,2 eq), MeOH, RT., 24 Std; (e) CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, NaCN (kat), DCM / MeOH (1:1), DMSO, DMF, 0 °C, 6 Tage. (f) (1) verd. NH<sub>3</sub>-Lösung (5 %); (2) Triphosgen, Pyridin, DCM, 0 °C, 3 Std; (g) **21**, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2-Butanon, 80 °C, 16 Std; (h) THF / MeOH (2:1), Ammoniumformiat, Pd / C (10 %), 75 °C, 20 min.

Die asymmetrische Synthese erfolgte analog zur Darstellung der *R*- und *S*-Enantiomere von Marbostat-100 (**R-13a** und **S-13a**), wobei als Ausgangsprodukt kommerziell verfügbares

5-Benzyloxyindol (**14b**) gewählt wurde. Die 5-Benzyloxy-Schutzgruppe ist einerseits stabil und reaktiv genug, um die Kopfgruppe 1 unter den für *R*- und *S*-Marbostat-100 (**R-20a** und **S-20a**) beschriebenen Bedingungen aufzubauen, und andererseits konnte diese unter milden katalytischen Konditionen gespalten werden. Dadurch konnte eine hohe Enantioselektivität gewährleistet werden.

Die Addition des 5-Benzyloxyindols (**14b**) an das Nitroalken **101** wurde durch die entsprechenden zuvor *in situ* aktivierten **97a** und **97b** katalysiert.<sup>135</sup> Hierbei erwies sich die für *R*- und *S*-Marbostat-100 im Rahmen von Vorversuchen ermittelte Molmenge (25 mol-%) (s. Kap. 3.7.3.2; **Tab. 3.1**) des Katalysators ebenfalls als geeignet. Die Bestimmung der absoluten Konfiguration an der CH-aziden Position (C-6) nach Methode B (s. Kap. 3.7.6) ergab, dass es sich bei Ethyl 2-(5-benzyloxy)-1*H*-indol-3yl)-3-nitropropanoat (**R-108** / **S-108**) um das *S*-Enantiomer handelt, wenn (1*S*, 2*R*)-amino-2,3-dihydro-1*H*-inden-2ol (**95b**) verwendet wurde. Folglich wurde beim Gebrauch von (1*R*, 2*S*)-amino-2,3-dihydro-1*H*-inden-2ol (**95a**) das *R*-Enantiomer erhalten. Dies ist interessant, da damit die von Ganesh *et al.*<sup>135</sup> beschriebene Vorschrift für das *S*-Enantiomer um das *R*-Enantiomer erweitert werden konnte. Die Reduktion von **R-108** und **S-108** zu den entsprechenden Aminen **R-109** und **S-109**, sowie der Aufbau des C-Ringes mittels Pictet-Spengler-Reaktion **R-110** und **S-110** erfolgten in Analogie zu *R*- und *S*-Marbostat-100 (s. Kap. 3.7.3.2; **Abb. 3.27**, Reaktionen c-d). Aufgrund des 5-Benzyloxy-Substituenten wiesen **R-110** und **S-110** eine **R-103** und **S-103** veränderte Löslichkeit auf, wodurch die für *R*- und *S*-Marbostat-100 beschriebene Aminolyse (s. Kap. 3.7.3.2) zu den entsprechenden Amiden **R-111** und **S-111** in einer Kombination aus verschiedenen organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden musste (s. **Abb. 3.34**, Reaktion e; Kap. 9.4.10). Im Unterschied zur *R*- und *S*-Marbostat-100 Synthese konnten **R-20b** und **S-20b** nur nach vorhergehender Freisetzung der Base von **R-111** und **S-111** mit verdünnter NH<sub>3</sub>-Lösung (5 %) erfolgen. In Analogie zur Lit.<sup>140</sup> erfolgte im Anschluss der Ringschluss (D-Ring) mit Triphosgen als C=O-Komponente und Pyridin als Base.

Um die Endverbindungen **R-13h** und **S-13h** zu erhalten, wurde zunächst der Indol-Stickstoff mit dem Benzyl-Linker **21** unter K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Katalyse zu **R-22b** und **S-22b** (**Abb. 3.34**) alkyliert. In der Folge wurde in 5-Stellung katalytisch mit Pd / C (10 %) und Ammoniumformiat unter atmosphärischen Druck die O-Benzyl-Schutzgruppe gespalten (**R-22d** und **S-22d**).<sup>154</sup> Im Unterschied zur racemischen Darstellung von **13h** (vgl. Kap. 3.1; **Abb. 3.4**, Reaktion b) wurde Ammoniumformiat anstelle von H<sub>2</sub> verwendet (s. **Abb. 3.34**, Reaktion h), da die Debenzylierung mit Pd / C und H<sub>2</sub> zur Racemisierung führte.<sup>154</sup>

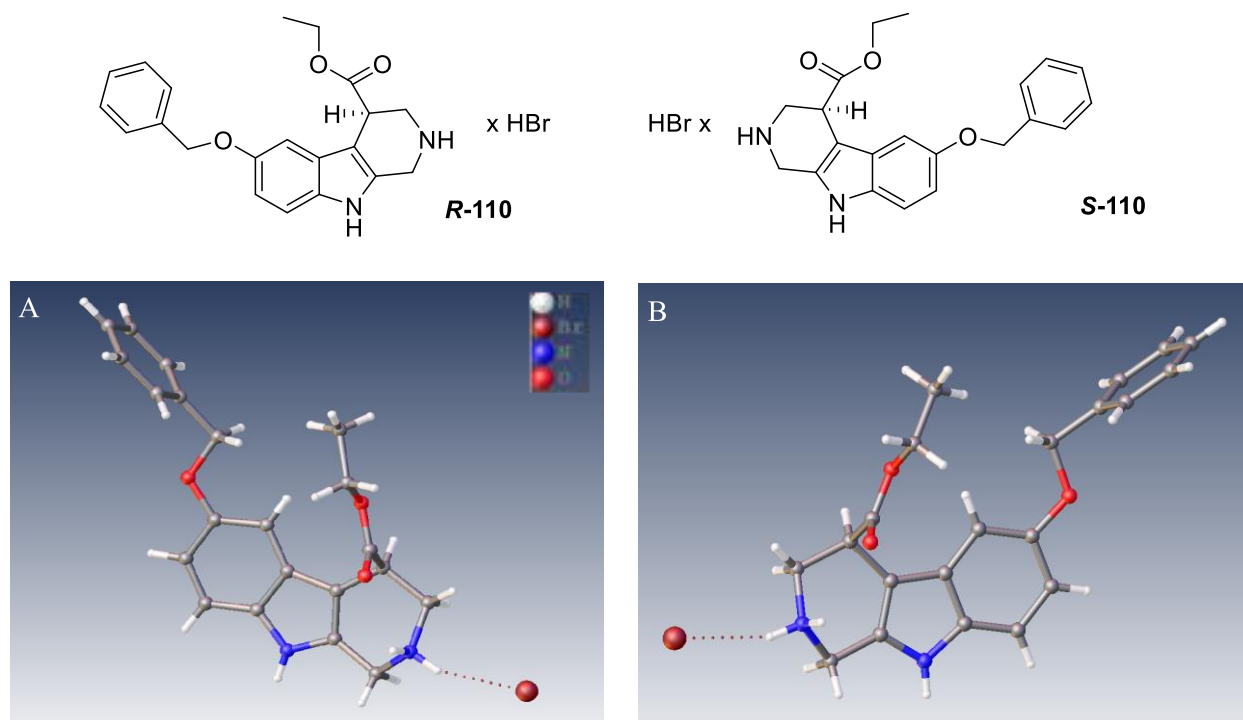


**Abb. 3.35.** Enantioselektive Synthese von **R-13h** und **S-13h**. Reagenzien und Bedingungen: (a) **30**,  $K_2CO_3$ , 2-Butanon, 80 °C, 1 Tag; (b) DCM, TFA, RT.; (c)  $NH_2OTHP$  (**25**, 4 eq), BOP (**24**, 1,2 eq), DIPEA (3,5 eq), THF, RT., 1,5 Std; (d) DCM,  $HCl_{(iprop)}$ , RT..

Anschließend wurde die Alkylierung zu **R-22h** und **S-22h** an der Position 8 mit **30** und  $K_2CO_3$  als Base durchgeführt. Dabei war es entscheidend, die erläuterte Reihenfolge der beiden Alkylierungen (s. **Abb. 3.34**, Reaktion g und **Abb. 3.35**, Reaktion a) zu wählen, da eine zuvorgehende Substitution durch die Morpholin-Struktur eine Alkylierung am Indol-Stickstoff verhinderte. Die nachfolgenden Stufen, Spaltung der *tert*-Butyl-Schutzgruppe zu **R-23h** und **S-23h** und Amidierung mit  $NH_2OTHP$  zu **R-26h** und **S-26h** wurden in Analogie zur Darstellung von *R*- und *S*-Marbostat-100 (vgl. Kap. 3.7.3.2; **Abb. 3.27**, Reaktionen b-d) durchgeführt. Aufgrund der guten Wasserlöslichkeit durch die Morpholin-Kopfgruppe musste die Darstellung der Hydroxamsäuren **R-13h** und **S-13h** modifiziert werden (s. **Abb. 3.35**). Dabei erfolgte eine milde saure Spaltung der O-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2yl)-Gruppe mit  $HCl_{(iprop)}$ . Das Salz der entsprechenden Säuren **R-13h** und **S-13h** wurde durch graduelle Kristallisation erhalten. Für das *N*-Hydroxy-4-(((6*R*)-4-methyl-8-(2-morpholinoethoxy)-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzamid hydrochlorid (**R-13h**) konnte ein ee-Wert von 94 % bei einer Ausbeute von 71 % erhalten werden. Das enantiomere *S*-Derivat **S-13h** wies ebenfalls einen ee-Wert von 94 % (Ausbeute: 80 %) auf.

Zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses wurden als Referenzen zu allen von der racemischen Darstellung abweichenden Synthesestufen die racemischen Verbindungen in Analogie zur asymmetrischen Synthese nachsynthetisiert. Die Überprüfung der jeweiligen

Enantiomerenreinheit erfolgte analog zu der in Kap. 3.7.4 und 3.7.5 beschriebenen Vorgehensweise.

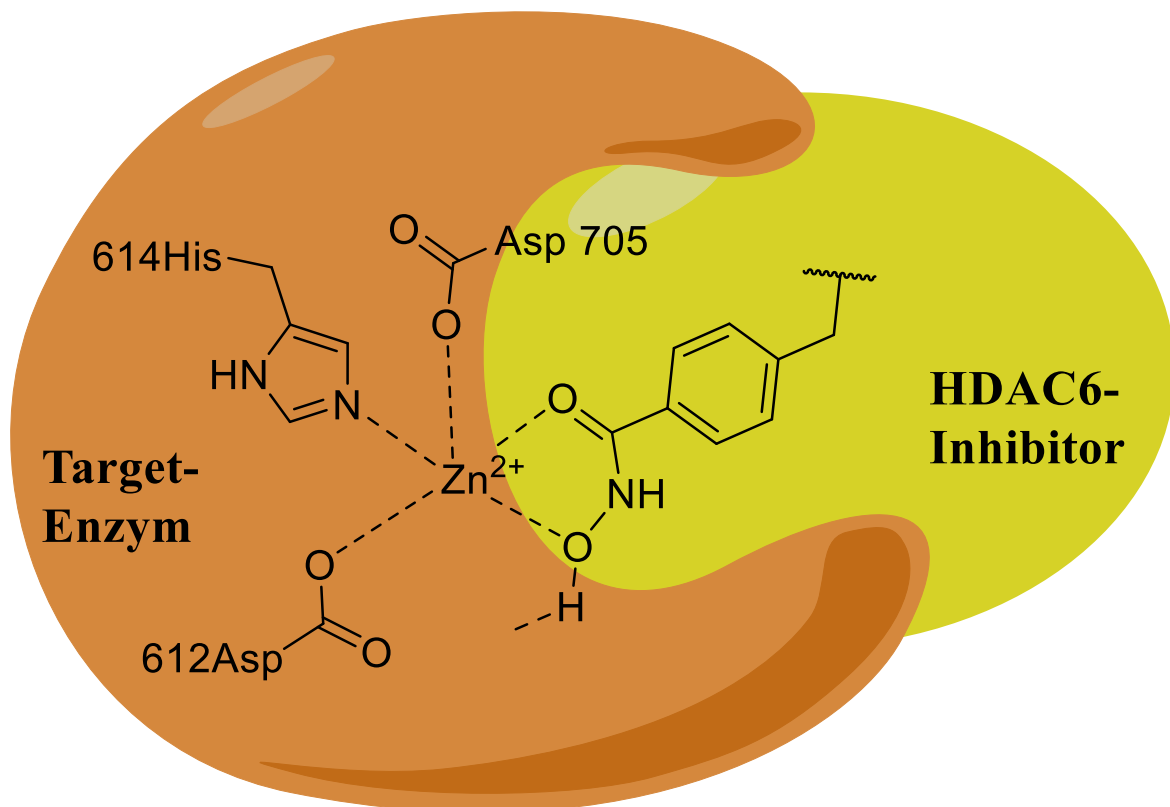


**Abb. 3.36.** Röntgenkristallstrukturen von **R-110** und **S-110**. *R*-Ethyl-6-(benzyloxy)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat (**R-110**) (A) und *S*-Ethyl 6-(benzyloxy)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat (**S-110**) (B) liegen als Hydrobromid-Salze vor. Die Legende bei (A) erläutert die Farbgebung für die einzelnen Atome. Die Messung und Berechnung der Röntgenstrukturdaten erfolgte durch die Abteilung für Röntgenstrukturanalyse der Universität Regensburg an der Fakultät Chemie und Pharmazie.

Die Bestimmung der absoluten Konfiguration erfolgte hier anhand von **R-110** und **S-110** (s. **Abb. 3.36**) ausschließlich über die Bildung von Hydrobromid-Salzen (s. Kap. 3.7.6, Methode B), da mit dem Hilfsreagenz (-)-Di-*p*-toluolyl-*L*-Weinsäure ((-)-**107**) keine geeigneten Kristalle der diastomeren Salze erhalten werden konnten.

## Kapitel 4

### Pharmakologischer Teil (I von IV)



## **4 *In vitro*-Testung: HDAC-Enzym-Inhibitions-Assays**

### **4.1 Einleitung**

#### **4.1.1 Bedeutung der Enzym-Inhibitions-Assays**

Die traditionelle Forschung zu neuen Arzneistoffen basiert auf der Entwicklung von selektiven Substanzen, die ein spezifisches Target in seiner Aktivität modulieren und damit die Pathophysiologie der Erkrankung steuern.<sup>155</sup> Obwohl der Trend in der modernen Arzneistoff-Forschung dahin geht, dass Verbindungen konzipiert werden, die mit mehreren Targets interagieren, um damit die Anzahl an Medikamenten zu reduzieren, stellen einzelne Enzyme jedoch weiterhin die wesentlichen Targets dar.<sup>156</sup> Die Tatsache, dass 47 % aller aktuellen Arzneistoffe Enzyme hemmen, ist darin begründet, dass eine durch diese Arzneistoffe hervorgerufene Veränderung in der Enzymaktivität einen sofortigen und definierten Effekt zur Folge hat.<sup>156</sup>

Trotz fortschrittlicher Methoden im Bereich der strukturbasierten und computergestützten Arzneistoffforschung, die die Suche nach einer geeigneten Leitstruktur erleichtern, ist der Test am Target nicht ersetzbar.<sup>156</sup> Daher erfolgt nach der Synthese eines neuen Wirkstoffes die Untersuchung der biologischen Aktivität am isolierten Protein.<sup>20</sup> Diese Vorgehensweise ermöglicht es unter anderem, den Wirkmechanismus zu ergründen und den Einfluss verschiedener Wirkstoffkonzentrationen auf die Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms zu untersuchen.<sup>157</sup> Dabei stellt die Tatsache, dass die Wechselwirkung zwischen Enzym und Testsubstanz ohne pharmakokinetische und pharmakologische Einflussfaktoren wie z.B. Absorptions- und Distributionseffekte erfasst werden kann, zunächst einen entscheidenden Vorteil dar. Die dadurch gewonnenen Erkenntnisse zur Struktur- und Wirkungsbeziehung erlauben es, gezielte Modifikationen am Pharmakophor der Testsubstanz vorzunehmen und damit die Interaktion zwischen Target und Wirkstoff zu optimieren, bevor diese in komplexeren Systemen (Zellassays oder *in vivo*-Modellen) untersucht wird.



### 4.1.2 Cheng-Prusoff-Gleichung

Der IC<sub>50</sub>-Wert, welcher der Inhibitor-Konzentration entspricht und erforderlich ist, um 50 % des Targets *in vitro* zu inhibieren, wird häufig dazu verwendet, um die inhibitorische Fähigkeit einer Testsubstanz auszudrücken.<sup>156,157</sup> Diese Schlussfolgerung anhand des IC<sub>50</sub>-Wertes zu treffen, kann jedoch irreführend sein, da zunächst der Reaktionstyp (Art der Inhibition) mit einbezogen werden muss.<sup>156</sup> Handelt es sich um einen reversiblen Inhibitor, so ist der IC<sub>50</sub>-Wert von der Substratkonzentration abhängig, während die IC<sub>50</sub>-Werte eines nicht-kompetitiven Inhibitors substratunabhängig sind.<sup>156</sup> Im Falle eines irreversiblen Inhibitors sind die IC<sub>50</sub>-Werte zeitabhängig.<sup>156</sup> Demnach haben die IC<sub>50</sub>-Werte wenig Aussagekraft, wenn die Kenntnis über den involvierten Hemmmechanismus fehlt.<sup>156</sup> Zudem stellt der IC<sub>50</sub>-Wert aufgrund seiner Abhängigkeit von der Substratkonzentration nur eine sehr begrenzte Möglichkeit dar, gemessene Werte in Relation zueinander zu setzen.<sup>157</sup> Da im Rahmen dieser Arbeit die synthetisierten Verbindungen in Bezug auf ihre inhibitorische Fähigkeit gegenüber verschiedenen HDAC-Isoformen getestet wurden, musste ein Messwert bestimmt werden, der Vergleiche zwischen den unterschiedlichen HDAC-Isoform-Assays ermöglicht.

Daher wurden die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte unter Zuhilfenahme der Cheng-Prusoff-Gleichung in die entsprechenden Inhibitor-Enzym-Dissoziationskonstante K<sub>i</sub> umgerechnet.<sup>157</sup> Die Umrechnung musste deswegen vorgenommen werden, da die IC<sub>50</sub>-Werte in der Regel nicht äquivalent zum K<sub>i</sub>-Wert sind, es sei denn, es liegt ein nicht-kompetitiver Inhibitor vor.<sup>157,158</sup> Im Falle eines kompetitiven Inhibitors sind die IC<sub>50</sub>-Werte sogar höher als die entsprechenden K<sub>i</sub>-Werte.<sup>157,159</sup>

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \left(\frac{S}{K_m}\right)}$$

**Abb. 4.1.** Cheng-Prusoff-Gleichung.

IC <sub>50</sub>	Inhibitorkonzentration, die eine 50 %ige Hemmung der Enzymaktivität bewirkt
K <sub>i</sub>	Enzym-Inhibitor-Dissoziationskonstante
K <sub>m</sub>	Enzym-Substrat-Dissoziationskonstante
S	Substratkonzentration [mol / L]

Von der Vielzahl der existierenden Cheng-Prusoff-Gleichungen, ist die hier dargestellte Form nur unter bestimmten Voraussetzungen für die Umwandlung von  $IC_{50}$ -Werten in  $K_i$ -Werte zulässig, und zwar, wenn ein Gleichgewichtszustand erreicht ist und es sich zudem um einen kompetitiven Inhibitor (Substrat und Inhibitor konkurrieren um dieselbe Bindungsstelle) handelt.<sup>157,160</sup> Des Weiteren müssen die Enzym-Substrat-Dissoziationskonstante ( $K_m$ ) und die Substratkonzentration (S) bekannt sein.<sup>157</sup>

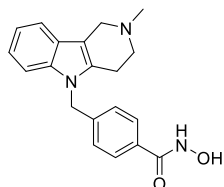
## 4.2 Ergebnisse

Im Vordergrund dieser Arbeit stand die Evaluierung der synthetisch hergestellten Verbindungen in Bezug auf ihre inhibitorische Fähigkeit zunächst am isolierten HDAC6-Enzym, dann im zellulären Testsystem (s. Kap. 5.2), schließlich im *in vivo*-Modell (s. Kap. 7.9).

Sofern im Vergleich zu einem etablierten HDACi die inhibitorische Wirksamkeit vergleichbar war, wurde die Wirkung der Verbindung hinsichtlich ihrer Selektivität (Testung gegenüber HDAC2 und HDAC8) untersucht. Die  $IC_{50}$ -Werte wurden durch die Firma Reaction Biology Corporation (Malvern, PA, USA) mittels eines HDAC-Enzym-Inhibitions-Assay bestimmt. Die Durchführung dieses Assays ist in Kap. 10.1 beschrieben.

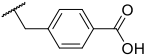
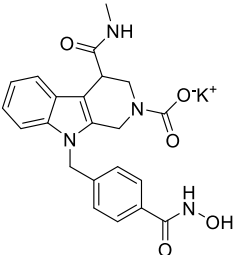
## 4.2.1 HDAC6-Inhibitoren mit Kopfgruppe 1

Referenzsubstanzen	Nr.	HDAC2	HDAC6	HDAC8
Trichostatin A (TSA)	2	3,55	0,58	145
Tubastatin A	10	> 1 130	7,56	1 697



### Modifikationen der Kopfgruppe 1

R	Spacer				
H		Marbostat-100 (13a)	774	0,70	173
8-O-Bz		13b	636	0,20	373
7-O-Bz		13c	631	0,23	234
8-OH		13d	106	0,41	67,8
8-(2-morpholinoethoxy) x HCl		13h	313	0,48	721
8-O-ethyl		13e	400	0,59	239
8-O-propyl		13f	262	0,08	140
8-O-butyl		13g	470	0,46	711

H		<b>23a</b>	> 10.000	> 20.000	> 40.000
		<b>32</b>	1.414	1,5	1.353

**Tab. 4.1.** Ergebnisse der Inhibitoren mit der Kopfgruppe 1 im HDAC-Inhibitions-Assay ( $K_i$ -Werte [nM]). Die  $IC_{50}$ -Werte wurden von der Firma Reaction Biology Corporation, USA bestimmt. Die Berechnung der  $K_i$ -Werte erfolgte aus den Mittelwerten der  $IC_{50}$ -Werte mittels Cheng-Prusoff-Gleichung. Als Referenzsubstanzen dienten der pan-Inhibitor Trichostatin A (TSA, **2**) und der selektive HDAC6i Tubastatin A (**10**).

Um die Potenz und Selektivität der synthetisierten Verbindungen in Bezug auf ihre HDAC6-Inhibition evaluieren zu können, wurde für die Auswertung des HDAC-Enzym-Inhibitions-Assays der HDAC6-spezifische Inhibitor Tubastatin A (**10**)<sup>17,47</sup> (s. Kap. 1.3.4.2) herangezogen. Dabei wurden für die Beurteilung der Struktur-Wirkungsbeziehungen die dargestellten Verbindungen nach den jeweiligen Kopfgruppen sortiert. Somit konnten die vorgenommenen Modifikationen innerhalb einer Substanzgruppe und die Auswirkungen auf die inhibitorische Aktivität besser miteinander verglichen werden.

Die Daten in **Tab. 4.1** verdeutlichen, dass alle Verbindungen mit Ausnahme von **23a** eine bevorzugte HDAC6-Hemmung aufweisen.

Marbostat-100 (**13a**) unterscheidet sich strukturell von Tubastatin A (**10**) durch den tetrazyklischen Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-Grundkörper. Durch diesen Austausch (trizyklischer Tetrahydro- $\gamma$ -carbolin-Grundkörper zu einem substituierten tetrazyklischen Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-Grundkörper) kann die inhibitorische Aktivität gegen HDAC6 um das 10-fache gesteigert werden ( $K_i$  nimmt von 7,56 nM auf 0,70 nM ab).<sup>57</sup> Bei einem Vergleich der Selektivitätsprofile ist die Selektivität von Marbostat-100 (**13a**) gegenüber HDAC6 in Bezug auf HDAC2 100-fach höher als die von Tubastatin A (**10**).<sup>57</sup> Der Selektivitätsunterschied bezogen auf HDAC8 fällt hingegen geringer aus (220-fach vs. 250-fach), ist jedoch weiterhin positiv für Marbostat-100 (**13a**, s. **Tab. 4.1**).

Von Selektivität wird im Rahmen dieser Arbeit dann gesprochen, wenn der  $K_i$ -Wert für HDAC6 mindestens 10-fach niedriger gegenüber den anderen Isoformen ist. Für die Überprüfung der Selektivität wurden HDAC2 und HDAC8 herangezogen, da HDAC2 ein

Vertreter der Klasse I HDACs ist und HDAC8 eine Isoform darstellt, dessen katalytische Bindungsseite Ähnlichkeiten zu HDAC6 aufweist.<sup>57</sup> Folglich weisen selektive HDAC6i, wie z.B. Tubastatin A (**10**), häufig auch eine Hemmwirkung gegen HDAC8 auf.<sup>47,57,161,162</sup>

Aufgrund der sehr guten Ergebnisse wurden weitere Modifikationen an der Kopfgruppe von Marbostat-100 (**20a**) vorgenommen. Diese umfassen Substitutionen an der 7- und 8-Position der Indol-Partialstruktur. Dabei sollten Hydroxy- **13d**, Benzyloxy- **13b** und **13c** und verschiedene Alkyloxy- **13e-g** Substituenten verglichen werden. Der Vergleich der Inhibitionskonstanten zeigt, dass durch die Einführung der Substituenten in Position 7 und 8 die inhibitorische Potenz gegenüber HDAC6 im Vergleich zur Leitverbindung **13a** verbessert werden kann. Im Fall von **13d** ist die Hydroxylgruppe in der Lage, als Wasserstoff-Akzeptor oder -Donor zu fungieren und damit Wechselwirkungen mit den Aminosäureresten der HDAC6 einzugehen, wodurch die Affinität erhöht wird.<sup>163</sup> Die Maskierung der Hydroxylgruppe mit raumeinnehmenden Benzyloxygruppen in **13b** und **13c** verbessert die  $K_i$ -Werte für HDAC6 um etwa 0,5 nM im Vergleich zu Marbostat-100 (**13a**). Damit tragen größere Reste an den Stellen 7 und 8 der Kopfgruppe 1 zu einer Steigerung der Selektivität bei, wie bei einem Vergleich mit **13d** demonstriert werden konnte (3000-fach bezogen auf HDAC2 für **13b** vs. 200-fach bezogen auf HDAC2 für **13d**, s. **Tab. 4.1**). Diese Verbesserung der Selektivität ist durch Modelling-Experimente zu erklären, die belegen, dass HDAC6 die größte aktive Bindungstasche innerhalb der HDAC-Familie besitzt (vgl. Kap. 2.1). Demnach trägt eine Interaktion zwischen der raumeinnehmenden Kopfgruppe und den Aminosäureresten in der Substratbindungsstelle zur Selektivitätssteigerung bei.<sup>17,53</sup>

Des Weiteren konnten weder im enzymatischen- noch im zellulären Assay nennenswerte Aktivitätsunterschiede zwischen Substitutionen an den verschiedenen Position (7 und 8) der Indol-Partialstruktur festgestellt werden. Aus diesem Grund und der Berücksichtigung des kostengünstigeren Ausgangsproduktes (5-Benzyloxyindol) erfolgten alle weiteren Modifikationen an der Position 8.

Die Alkyloxy-Derivate **13e-g** zeigten ebenfalls eine Präferenz für HDAC6 mit  $K_i$ -Werten im nanomolaren bzw. subnanomolaren Bereich, wobei der Propyloxy-Rest **13f** mit einer ausgeprägteren HDAC6-Inhibition und gesteigerten Selektivität (**13f**: 3000-fach vs. **13g**: 1000-fach) bezogen auf HDAC2 hervorzuheben ist. Damit konnte gezeigt werden, dass Derivatisierungen an der Position 8 der Indol-Partial-Struktur toleriert werden (s. **Tab. 4.1**).

Im nächsten Schritt sollte daher die Einführung der Morpholin-Struktur an C-8 über eine Alkyl-Substitution erfolgen. Diese sollte dazu dienen, die Hydrophilie der Kopfgruppe zu erhöhen und damit das Löslichkeitsverhalten (bevorzugt in H<sub>2</sub>O) zu optimieren (vgl. Kap. 5.2.3; **Tab. 5.1**). Damit sollte eine Verbindung erzeugt werden, die für eine mögliche orale Gabe innerhalb einer *in vivo*-Studie geeignet ist. Diese Modifikation führte zu K<sub>i</sub>-Daten, die im ähnlichen Bereich liegen, wie jene von **13g**. Bei einem Vergleich mit der Leitverbindung **13a** konnte durch die Einführung der Morpholin-Struktur die Selektivität gegenüber HDAC8 um das 8-fache gesteigert werden, während die Selektivität bezogen auf HDAC2 nur um das 1,6-fache abnahm (**13h**: 600-fache Selektivität vs. Marbostat-100 (**13a**): 1000-fache Selektivität). Demnach stellt **13h** unter Berücksichtigung der verbesserten Wasserlöslichkeit (s. Kap. 5.2.3) einen guten HDAC6i dar.

Im Zuge der Metabolisierungsstudie (s. Kap. 6.3.3) mit **13h** entstanden **23h** und **31** als Hydrolyseprodukte (HP). Zur Überprüfung, ob diese ihrerseits ebenfalls eine inhibitorische Wirkung aufweisen, wurden die K<sub>i</sub>-Werte der entsprechenden HP-Analoga (**23a** und **32**) mit den Enzym-Inhibitionsdaten von Marbostat-100 (**13a**) verglichen. Dabei konnte, wie bereits erwartet, festgestellt werden, dass die Abwesenheit der Zink-chelatisierenden Hydroxamsäure in **23a** zu einer fehlenden HDAC2 und HDAC6-Aktivität führte und eine signifikante Reduktion der Potenz gegenüber HDAC8 zu verzeichnen war.<sup>57</sup> Aus diesem Grund wurde für alle weiteren Verbindungen die Zink-chelatisierende Hydroxamsäure als entscheidendes Strukturmerkmal beibehalten.

Die Öffnung des D-Ringes führte zu **32**, das einen HDAC6-K<sub>i</sub>-Wert von 1,5 aufweist und somit in einem vergleichbaren Bereich zu Marbostat-100 (**13a**) liegt. Des Weiteren konnte für **32** eine ausgeprägte Selektivität gegenüber HDAC2 und HDAC8 verzeichnet werden.

Durch weitere Untersuchungen im zellulären Assay sollte dann evaluiert werden, ob **13b-h**, hinsichtlich der inhibitorischen Aktivität dem Marbostat-100 (**13a**) überlegen sind. Die Ergebnisse im zellulären Assay zeigen aber, dass **13a** die potenteste Verbindung im Rahmen dieser Arbeit ist.

Um die Selektivität dieser Verbindung detaillierter charakterisieren zu können, erfolgte die Evaluierung der Inhibitionskonstanten gegen weitere HDAC-Subtypen (s. **Tab. 4.2**).

Die Daten in **Tab. 4.2** demonstrieren, dass Marbostat-100 (**13a**) eine signifikante Selektivität gegenüber HDAC6 über alle neun Zink-abhängigen HDAC-Isoenzyme aufweist.<sup>57</sup> Dabei ist die Präferenz für HDAC6 um etwa 250-fach höher gegenüber HDAC8 und 2600-fach

gegenüber HDAC4.<sup>57</sup> Im Unterschied dazu weist Tubastatin A (**10**), ein repräsentativer selektiver HDAC6-Inhibitor<sup>20</sup>, bezogen auf HDAC8 nur eine 200-fache Selektivität auf (s. **Tab. 4.2**). HDAC8 stellt das Isoenzym dar, welches am ehesten strukturelle Ähnlichkeiten mit HDAC6 aufweist, weswegen selektive HDAC6i häufig dieses Isoenzym auch hemmen.<sup>57,161,162</sup> Daher lässt sich - bezogen auf diese Sybtypen - bereits bei einer geringfügigen Steigerung der Selektivität von einer Verbesserung sprechen.

HDAC Subtypen										
Verbindung	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11
<b>Marbostat-100 (13a)</b>	358	774	306	1821	701	0,7	442	173	452	495
<b>TSA (2)</b>	0,64	3,55	0,84	NB	NB	0,58	NB	145	4,76	401
<b>TMP 269 (112)</b>	NB	NB	NB	90,5	86,9	NB	46,3	2706	NB	NB

**Tab. 4.2.** Vergleich der Enzym-Inhibitionsdaten ( $K_i$ -Werte [nM]) für Marbostat-100 (**13a**) gegenüber HDAC-Subtypen HDAC1-8 und HDAC10-11 mit den Referenzsubstanzen TSA (pan-HDACi, **2**) und dem hoch potenten, selektiven und zelldurchgängigen Klasse IIa HDACi TMP 269 (**112**)<sup>164</sup>. TSA (**2**) und TMP 269 (**112**) wurden als Positivkontrolle verwendet. Die  $IC_{50}$ -Werte wurden von der Firma Reaction Biology Corporation, USA bestimmt. Die Berechnung der  $K_i$ -Werte erfolgte aus den Mittelwerten der  $IC_{50}$ -Werten mittels Cheng-Prusoff-Gleichung. [NB: Nicht bestimmt.]

## 4.2.2 HDAC6-Inhibitoren mit den Kopfgruppen 2-6

Aufgrund der sehr guten inhibitorischen Wirkung der Inhibitoren mit der Kopfgruppe 1 wurde bei der Entwicklung der Kopfgruppen 2 und 3 der Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-Grundkörper beibehalten. Der Unterschied zwischen Marbostat-100 (**13a**) und Marbostat-2 (**39**, Kopfgruppe 2) lag lediglich in einer zusätzlichen Methylengruppe (vgl. Kap. 3.3, Ring D). Während Marbostat-2 (**39**) eine verbesserte HDAC6-Hemmwirkung zeigte (**13a**:  $K_i$ -Wert = 0,70 nM vs. **39**:  $K_i$ -Wert = 0,50 nM), inhibitiert Marbostat-100 (**13a**) HDAC6 250 Mal stärker als HDAC8 und über 1000 Mal stärker als HDAC2 (s. **Tab. 4.3** und Kap. 4.2.1; **Tab. 4.1**). Demnach weist **13a** im Vergleich zu **39** eine höhere Selektivität auf.

Ob die Ausrichtung des D-Ringes entscheidend für die Aktivität des Inhibitors ist, wurde durch die anguläre Anellierung der Hydantoin-Partialstruktur an die Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-Grundstruktur die Kopfgruppe 3 untersucht. Dabei konnte ein deutlicher Aktivitätsunterschied zu den bisher vorgestellten Verbindungen verzeichnet werden. Mit einem HDAC6- $K_i$ -Wert von 7,01 nM weist **49** eine auf 10 % verminderte inhibitorische Potenz im Vergleich zu

Marbostat-100 (**13a**) (HDAC6-K<sub>i</sub>-Wert = 0,70 nM) auf. Stattdessen wird eine deutlich stärkere Inhibition von HDAC8 (**49**: HDAC8-K<sub>i</sub>-Wert = 57,5 nM vs. **13a**: HDAC8-K<sub>i</sub>-Wert = 173 nM) gemessen, wodurch eine Selektivitätsabnahme von **49** gegenüber dem Target-Enzym zu verzeichnen ist (s. **Tab. 4.1** und **4.3**). Eine denkbare Begründung für diese Aktivitätsunterschiede könnte darin zu finden sein, dass der anguläre D-Ring eine sterische Behinderung für den Benzyl-Linker darstellt und somit der optimale Eintritt in den hydrophoben Tunnel des Enzyms erschwert wird.<sup>57</sup>

Die Kopfgruppen 4 und 5 unterscheiden sich von den bisher vorgestellten Kopfgruppen 1-3 darin, dass in den Tetrahydro- $\gamma$ -carbolin-Grundkörper des Tubastatins die Hydantoin-Partialstruktur in Form des D-Ringes anelliert wurde ( $\gamma$ -Marbostat-100) (vgl. Kap. 2). Damit sollte eine Möglichkeit geschaffen werden, Tubastatin A (**10**), Marbostat-100 (**13a**) und  $\gamma$ -Marbostat-100 (**61**) miteinander zu vergleichen. Die Kopfgruppe 4 unterscheidet sich zur Kopfgruppe 5 darin, dass Letztere einen um eine Methylengruppe erweiterten D-Ring aufweist. Bei Betrachtung der HDAC6-K<sub>i</sub>-Werte von **61** und **65** zeigt sich, dass in diesen Fällen die Ausrichtung des D-Ringes im Vergleich zu **49** nicht zu einer sterischen Behinderung führt und damit zu einer besseren HDAC6-Hemmaktivität beiträgt. Des Weiteren kann bei einem Vergleich mit Tubastatin A (**10**) beobachtet werden, dass die Anellierung der Hydantoin-Partialstruktur **61** zu einer Steigerung der HDAC6-Inhibition (**10**: HDAC6-K<sub>i</sub>-Wert = 7,56 nM vs. **61**: HDAC6-K<sub>i</sub>-Wert = 1,86 nM) bei gleichzeitig verbesserter Selektivität (gegenüber HDAC2 und HDAC8) führt. Damit scheint die Hydantoin-Partialstruktur (D-Ring) eine essentielle Funktion bei der Hemmwirkung einzunehmen.

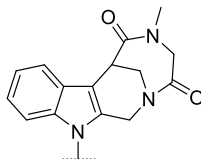
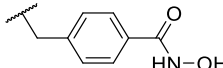
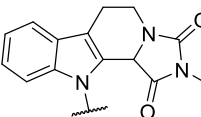
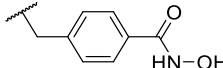
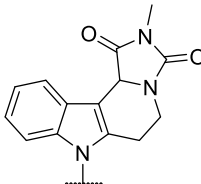
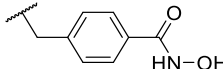
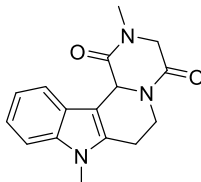
Der Austausch der Hydantoin-Partialstruktur durch eine homologe Hydantoin-Partialstruktur (Erweiterung um eine Methylengruppe, s. Kap. 3.5) hingegen vermindert die inhibitorische Potenz (**65**: HDAC6-K<sub>i</sub>-Wert = 3,43 nM vs. **61**: HDAC6-K<sub>i</sub>-Wert = 1,86 nM), und die Selektivität für HDAC6 im Vergleich zu den Isoformen HDAC2 und HDAC8 (vgl. **Tab. 4.3**) nimmt ab.

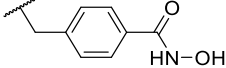
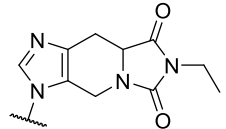
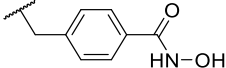
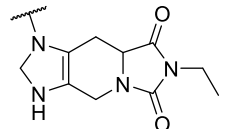
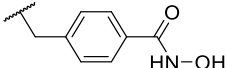
Der Vergleich der Daten von Marbostat-100 (**13a**) und  $\gamma$ -Marbostat-100 (**61**) zeigt, dass die Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-Grundstruktur zu einer ausgeprägteren HDAC6-Affinität führt. Damit scheint neben der Hydantoin-Partialstruktur auch das Vorliegen einer Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-Grundstruktur für die gesteigerte inhibitorische Aktivität und das verbesserte Selektivitätsprofil von **13a** verantwortlich zu sein.



Um zu verifizieren, inwieweit die Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-Grundstruktur für die sehr gute Wirkung der Leitverbindung **13a** verantwortlich ist, wurde im Rahmen eines „Scaffold Hoppings“ (s. Kap. 3.6.1) die Kopfgruppe 6 synthetisiert. Dabei wurde der Marbostat-100-Grundkörper durch die Histidin-Substruktur (s. Kap. 3.6.1; **Abb. 3.15**) ersetzt. Der Fokus lag dabei darauf, zu untersuchen, ob durch das „Scaffold Hopping“ die inhibitorische Potenz in Bezug auf die HDAC6-Inhibition beeinträchtigt oder verbessert wird.

Aufgrund von Kosten-Nutzen-Abwägungen wurde für die Verbindungen **74a** und **74b** im enzymatischen Testsystem nur eine Einfachbestimmung durchgeführt und die Prüfung auf Selektivität nur im zellulären System vorgenommen (s. Kap. 5.2.2). Die beiden Verbindungen zeigen im Vergleich zu allen anderen im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen die schlechtesten HDAC6-K<sub>i</sub>-Werte (s. **Tab. 4.3**).

	Nr.	HDAC2	HDAC6	HDAC8	
<div><div></div><div></div></div>	Kopfgruppe 2	Marbostat 2 (39)	491	0,50	67,1
<div><div></div><div></div></div>	Kopfgruppe 3	49	4 529	7,01	57,5
<div><div></div><div></div></div>	Kopfgruppe 4	61	995	1,86	761
<div><div></div></div>	Kopfgruppe 5	65	537	3,43	166

					
	Kopfgruppe 6	74a	NB	12,1	NB
					
		74b	NB	12,4	NB
					

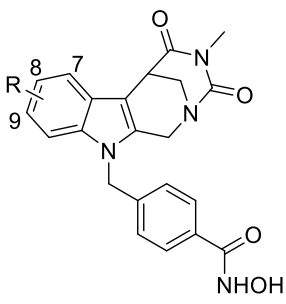
**Tab. 4.3.** Ergebnisse der Inhibitoren mit den Kopfgruppen 2-6 im HDAC-Inhibitions-Assay ( $K_i$ -Werte [nM]). Die Berechnung der  $K_i$ -Werte erfolgte aus den Mittelwerten der  $IC_{50}$ -Werte mittels Cheng-Prusoff-Gleichung. [NB: nicht bestimmt.]

### 4.2.3 Stereochemie und biologische Aktivität der HDAC6-Inhibitoren mit Kopfgruppe 1

Aufgrund der sehr guten Inhibitionsdaten von **13a** sowohl im enzymatischen als auch im zellulären System (s. Kap. 4.2.1 und Kap. 5.2) wurden die beiden Enantiomere (**R-13a** und **S-13a**) dargestellt, um den Einfluss der Stereochemie auf die biologische Wirkung zu prüfen. Die racemische Verbindung **13h**, die im Zuge der Derivatisierung der Kopfgruppe 1 entstand, weist im Vergleich zu Marbostat-100 (**13a**) ein verbessertes Löslichkeitsverhalten auf, weswegen von dieser Substanz ebenfalls die beiden Enantiomere **R-13h** und **S-13h** synthetisiert wurden.

Alle vier dargestellten Enantiomere (**R-13a** und **S-13a** sowie **R-13h** und **S-13h**) weisen HDAC6- $K_i$ -Werte im nanomolaren bzw. subnanomolaren Bereich auf (s. **Tab. 4.4**). Dabei fällt jedoch auf, dass die *S*-Enantiomere **S-13a** und **S-13h** jeweils die Eutomere mit  $K_i$ -Werten von 0,70 nM und 0,63 nM repräsentieren. Das eudismische Verhältnis in Bezug auf die beiden Enantiomere des Marbostat-100 (**R-13a** und **S-13a**) beträgt dabei 0,35 ( $K_i$ -Wert von **R-13a** bei 2,01 nM)<sup>57</sup>, während der Quotient aus der Aktivität des Eutomers und der Aktivität des Distomers von **13h** bei 0,43 ( $K_i$ -Wert von **R-13h** bei 1,45 nM) liegt. Die Erkenntnis, dass es sich bei den *S*-Enantiomeren (**S-13a** und **S-13h**) um die Eutomere und

bei den *R*-Enantiomeren (***R*-13a** und ***R*-13h**) um die Distomere handelt, sollte im zellulären Testsystem zusätzlich geprüft werden (s. Kap. 5.2.7).

Stereochemie der Derivate der Kopfgruppe 1	Nr.	HDAC2	HDAC6	HDAC8
				
R				
H	<b>Marbostat-100 (13a)</b>	774	0,70	173
H	<b><i>R</i>-Marbostat-100 (<i>R</i>-13a)</b>	3 195	2,01	294
H	<b><i>S</i>-Marbostat-100 (<i>S</i>-13a)</b>	5 205	0,70	999
8-(2-morpholinoethoxy) x HCl	<b>13h</b>	313	0,48	721
8-(2-morpholinoethoxy) x HCl	<b><i>R</i>-13h</b>	1 349	1,45	327
8-(2-morpholinoethoxy) x HCl	<b><i>S</i>-13h</b>	187	0,63	238

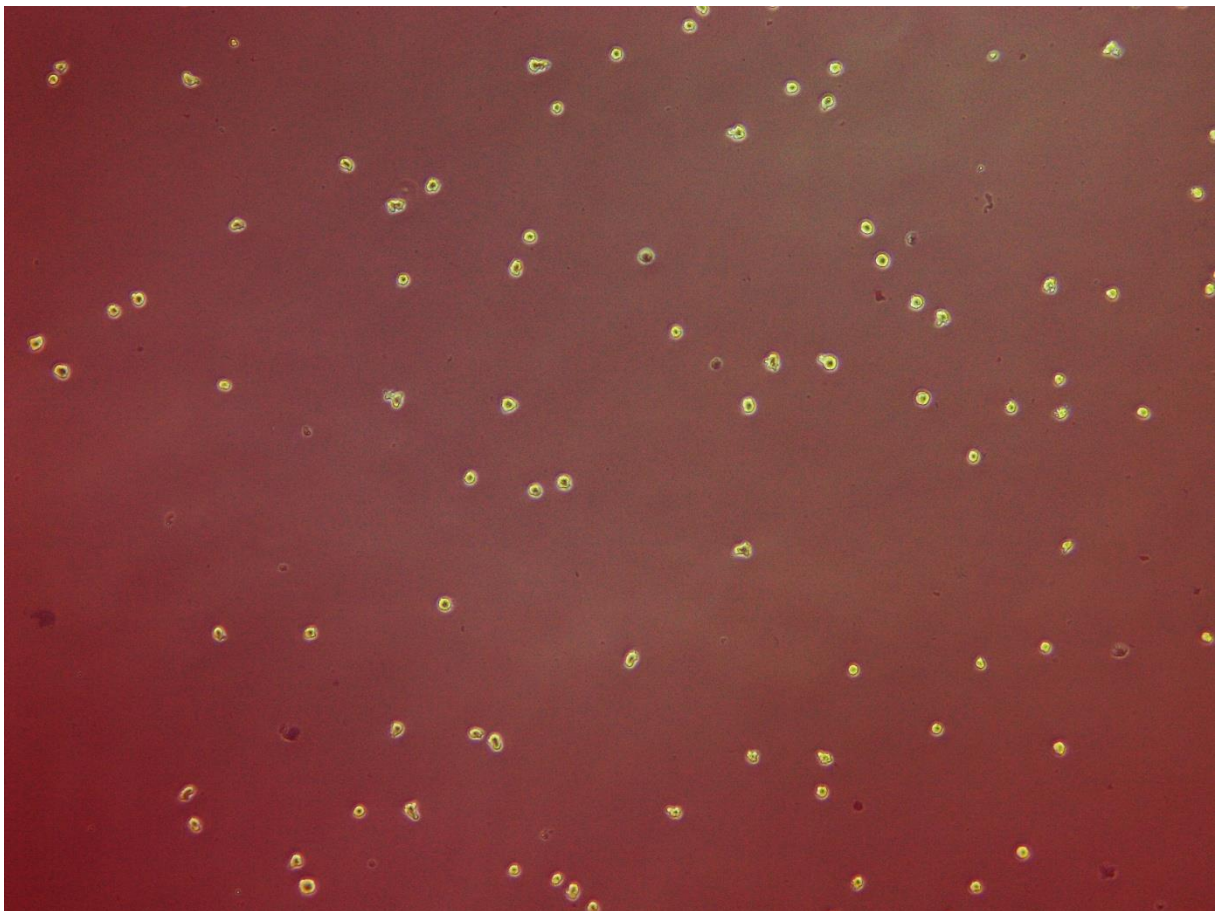
**Tab. 4.4.** Ergebnisse der enantiomerenreinen Inhibitoren mit der Kopfgruppe 1 im HDAC-Inhibitions-Assay ( $K_i$ -Werte [nM]). Die Berechnung der  $K_i$ -Werte erfolgte aus den Mittelwerten der  $IC_{50}$ -Werte mittels Cheng-Prusoff-Gleichung.

#### **4.2.4 Zusammenfassung der Enzym-Inhibitionsdaten für die Verbindungen mit Kopfgruppen 1-6**

Alle Verbindungen wiesen mit Ausnahme von **23a** (keine HDAC6-Inhibition) und **74a**, **74b** und **49** (moderate HDAC6-Hemmwirkung) sehr gute inhibitorischen Aktivitäten auf. Dabei brachten die Vertreter mit Kopfgruppe 1, insbesondere die Leitverbindung Marbostat-100 (**13a**), Ergebnisse hervor, die **13a** als den potentesten und selektivsten HDAC6i im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Stereochemie einen entscheidenden Einfluss auf die biologische Aktivität hat. Demnach sollten alle Substanzen im zellulären System auf ihre inhibitorische Fähigkeit untersucht werden, um abschätzen zu können, inwieweit sich die enzymatischen Ergebnisse auf ein komplexeres System übertragen lassen.

## Kapitel 5

### Pharmakologischer Teil (II von IV)



## **5 *In vitro*-Testung: zelluläre HDAC6-Inhibitions-Assays**

### **5.1 Einleitung**

#### **5.1.1 Bedeutung der Zellkultur**

1903 konnte bereits von Justin Jolly<sup>165</sup> gezeigt werden, dass Zellen die Fähigkeit besitzen, in einer künstlichen Umgebung zu leben.<sup>166</sup> In den Anfängen der Entwicklung von *in vitro* Gewebs- und Zellkulturtechniken war es zunächst nur möglich, das Wachstum von relativ unbedeutenden Zellen für wenige Tage aufrechtzuerhalten.<sup>166</sup> 1907 gelang es Ross Harrison, erstmals Nervenzellen bis zu 30 Tagen in Kultur zu halten.<sup>167</sup> Die ersten Zelltypen, die in Langzeitkulturen angelegt werden konnten, waren embryonale Zellen, Leukozyten, Fibroblasten und Chronodozyten tierischen und menschlichen Ursprungs.<sup>166</sup> Die Fortschritte (aseptische Bedingungen, definierte Vorschriften zur Kultivierung, Nährstoffzusätze etc.) der letzten Jahre trugen dazu bei, dass die Zellkulturtechniken deutlich verbessert werden konnten und heutzutage eine enorme Vielfalt an Zelltypen und Kulturmedien zur Verfügung steht.<sup>166,167</sup>

Die fortschrittliche Entwicklung von *in vitro*-Techniken ist in Anbetracht dessen, das in den letzten Jahren die Produktion von potentiellen Arzneistoffen zugenommen hat, eine rationelle Alternative, um *in vivo*-Verfahren zu reduzieren bzw. teilweise zu ersetzen. Neben der Arzneistoff-Entwicklung findet die Zellkultivierung Verwendung z.B. bei Zytotoxizitäts- oder Genotoxizitätstests, bei der Aufklärung von molekularbiologischen Vorgängen sowie in der Herstellung von „Biologicals“ (z.B. rekombinante Proteine und Impfstoffe).<sup>167,168</sup>

Mit den heutigen Techniken ist es möglich, Zellen, die aus verschiedenen Geweben und Organismen entnommen wurden, *in vitro* zu kultivieren. Dabei wird grundsätzlich zwischen primären und kontinuierlichen Zellen differenziert. Bei den Primärzellen handelt es sich um Zellen, deren Entnahme aus dem Gewebe oder Organ erst kürzlich erfolgt ist und deren Lebensdauer auf einen kurzen Zeitraum begrenzt ist.<sup>167</sup> Kontinuierliche Zellen bzw. Zelllinien hingegen besitzen die Fähigkeit, sich unter Kulturbedingungen ständig weiter zu vermehren.<sup>167</sup> Primärzellen wird häufig der Vorzug gegenüber den Zelllinien gegeben, da sie die physiologischen Bedingungen besser widerspiegeln. Zudem wird das Risiko, signifikante Unterschiede in den Ergebnissen durch Veränderungen des Phänotyps (häufige Subkultivierung) zu erhalten, minimiert.<sup>166,168</sup>

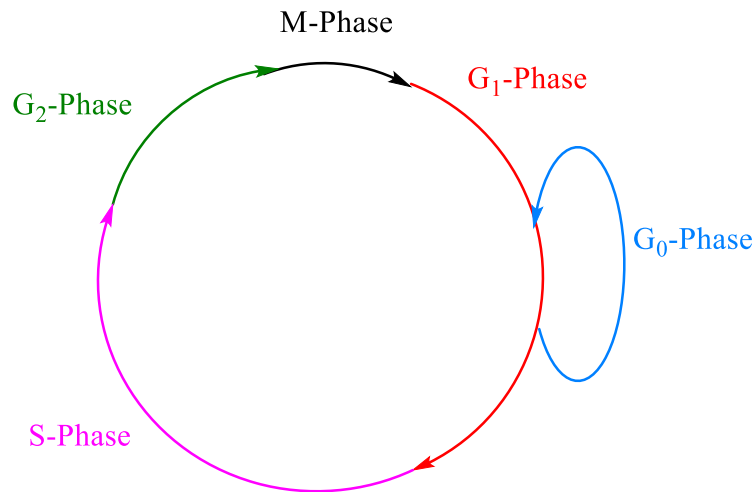
Durch die bestehende Kooperation zur Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Oliver Krämer (Institut für Toxikologie, Universitätsklinikum Mainz) war die Zugänglichkeit zu etablierten Zelllinien und damit diesen gegenüber den Primärzellen der Vorzug gegeben. Des Weiteren stand ein reichhaltiges Datenmaterial seitens des Kooperationspartners zur Verfügung, sodass zwecks der Vergleichbarkeit nicht von Zelllinie auf Primärzelle gewechselt wurde.

Des Weiteren wird zwischen adhärenenten Zellen und Suspensionszellen unterschieden, wobei bei den erstgenannten im Vergleich zu den Suspensionszellen auf eine passende Wachstumsoberfläche zur Anheftung geachtet werden muss.<sup>168</sup> Zu den adhärenenten Zellen gehören beispielsweise Fibroblasten und Endothelzellen, während Lymphozyten zu den Suspensionszellen zählen.<sup>168</sup> Da im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich mit Suspensionszellen gearbeitet wurde, wird in der Folge nicht auf die Besonderheiten eingegangen, die beim Umgang mit adhärenenten Zellen zu beachten sind.

Aufgrund der Tatsache, dass im Rahmen der *in vitro*-Testungen die Leitverbindung Marbostat-100 (**13a**) hinsichtlich ihres Einflusses auf den Zellzyklus (Veränderung der Verteilung der Zellzyklusphasen) untersucht wurde, wird an dieser Stelle auf die Zellzyklus-Vorgänge unter physiologischen Bedingungen eingegangen.

### **5.1.2 Zellzyklus**

Der eukaryotische Zellzyklus lässt sich in zwei wesentliche Phasen teilen: Mitose (M-Phase) und Interphase. Beide sind aus weiteren Phasen zusammengesetzt.<sup>169</sup> Die Interphase (G<sub>1</sub>-Phase, G<sub>0</sub>-Phase, G<sub>2</sub>-Phase und S-Phase) macht 95 % des Zellzyklus aus und ist für das Zellwachstum und die Stoffwechselaktivität zuständig.<sup>169,170</sup> In der M-Phase hingegen werden die Chromosomen verdoppelt und auf die Zellkerne der Tochterzellen übertragen.<sup>169</sup>



**Abb. 5.1.** Die verschiedenen Zellzyklusphasen. Durch die farbliche Darstellung soll der jeweilige zeitliche Anteil der Phase am Zellzyklus verdeutlicht werden.

M-Phase: Diese Phase lässt sich in Prophase, Prometaphase, Metaphase und Telophase unterteilen, wobei Letztere die eigentliche Zellteilungsphase darstellt.<sup>169</sup>

G<sub>1</sub>-Phase: Diese Phase repräsentiert ein Intervall zwischen der Mitose und der DNA-Replikation.<sup>170</sup> Während dieser Phase ist die Zelle metabolisch aktiv und wächst kontinuierlich weiter, wobei keine Verdopplung des Erbgutes stattfindet.<sup>170</sup>

G<sub>0</sub>-Phase: Diese Phase stellt eine Sonderform der G<sub>1</sub>-Phase dar, da sich Zellen in dieser Phase nicht mehr im Zellzyklus befinden. Der reversible Eintritt in diese Phase erfolgt ausgehend von der G<sub>1</sub>-Phase und ist für ausdifferenzierte Zelltypen, wie Nerven-, Leber- und Muskelzellen charakteristisch.<sup>169</sup> Sie bewahren ihre metabolische Aktivität, weisen jedoch keine Proliferation auf.<sup>170</sup>

S-Phase: In der dann folgenden DNA-Synthese-Phase findet die Replikation der DNA statt.<sup>169,170</sup>

G<sub>2</sub>-Phase: Zur Vervollständigung der DNA-Synthese wird das Zellwachstum in dieser Phase fortgesetzt, und Proteine zur Vorbereitung für die Mitose werden synthetisiert.<sup>169</sup>

Zellen, die sich in verschiedenen Phasen des Zellzyklus befinden, weisen einen unterschiedlichen DNA-Gehalt auf und können anhand dessen den einzelnen Zellzyklusphasen zugeordnet werden.<sup>170,171</sup> Diese Tatsache findet nicht nur Anwendung in der klinischen Diagnostik, um krankheitsbedingte Änderungen des DNA-Gehaltes zu ermitteln,



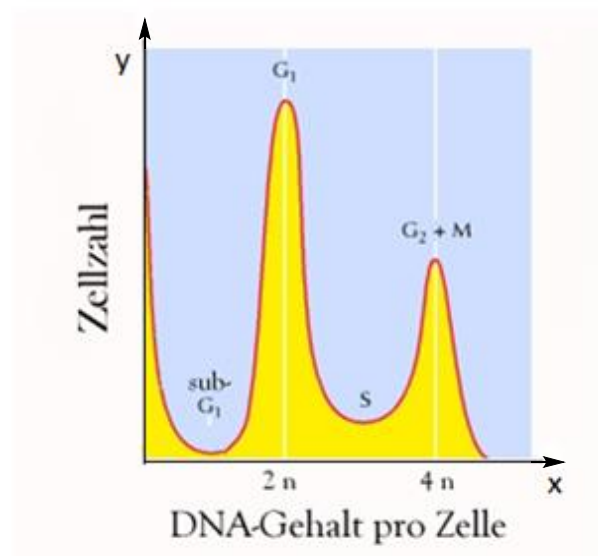
sondern auch in der zellbiologischen Forschung, um Rückschlüsse auf den Zellzustand ziehen zu können.<sup>171</sup>

In den Phasen  $G_1$  und  $G_0$  sind die Zellen diploid (doppelter Chromosomensatz), so dass deren DNA-Gehalt mit  $2n$  bezeichnet werden kann.<sup>170</sup> Dabei kennzeichnet  $n$  den haploiden (einfachen Chromosomensatz) DNA-Gehalt im Genom.<sup>170</sup>

Beim Übergang der Zellen aus der  $G_0/G_1$ -Phase in die S-Phase nimmt der DNA-Gehalt, durch die Replikation zu ( $2n \rightarrow 4n$ ).<sup>170</sup> Zellen, die sich in der S-Phase befinden, weisen damit einen DNA-Gehalt auf, der im Bereich von  $2n$  bis  $4n$  liegt.<sup>170</sup> In der  $G_2$ - und M-Phase bleibt der DNA-Gehalt im doppelten Zustand ( $4n$ ) und nimmt erst wieder nach der Cytokinese (Zellteilung) ab ( $2n$ ).<sup>170</sup> Bei Zellen in der Apoptose kann der DNA-Gehalt geringer sein als jener von Zellen, die sich in der  $G_0/G_1$ -Phase aufhalten.<sup>172</sup>

Experimentell kann der zelluläre DNA-Gehalt durch Inkubation der Zellen mit DNA-interkalierenden Substanzen (z.B. dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI)) mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden.<sup>170,171</sup> Die Fläche des nach der Bindung des Farbstoffes an die DNA erhaltenen Fluoreszenzsignals ist proportional zur DNA-Konzentration.<sup>171</sup>

Da apoptotische Zellen einen geringeren DNA-Gehalt als lebende oder ruhende Zellen ( $G_0/G_1$ -Phase) aufweisen, fällt das Fluoreszenzsignal schwächer aus als bei den Zellen in der  $G_0/G_1$ -Phase. Daher erscheint ein sogenannter sub- $G_1$ -Peak.<sup>172</sup>



**Abb. 5.2.** Schematische Darstellung zur Ermittlung des DNA-Gehaltes in den verschiedenen Zellzyklusphasen. Die Zellzahl (Y-Achse) wird gegen die Fluoreszenzintensität (X-Achse) aufgetragen, welche proportional zum DNA-Gehalt ist. Während Zellen in der  $G_1$  und  $G_2/M$ -Phase einen DNA-Gehalt von  $2n$  bzw.  $4n$  aufweisen, liegt der DNA-Gehalt von Zellen in der S-Phase genau zwischen diesen beiden Peaks. Der DNA-Gehalt der sub- $G_1$ -Phase liegt unterhalb der  $G_1$ -Phase. Darstellung in Anlehnung an Lit.<sup>170</sup>

### 5.1.3 Trennung, Transfer und Detektion der Target-Proteine

Nachdem in Kap. 4.2 die Hemmwirkung der Substanzen am isolierten Target (rekombinantes Enzym) evaluiert wurde, sollte neben der inhibitorischen Fähigkeit auch die Selektivität im zellulären System untersucht werden. Dabei ist der Western Blot eine geeignete Methode zur Identifizierung spezifischer Proteine, die aus einer komplexen Proteinmischung aus Zellen extrahiert wurden.<sup>173,174</sup> Neben dem Nachweis der Proteine ist auch die Quantifizierung des Proteinlevels möglich.<sup>173,174</sup> Dafür müssen die Proteine der Größe nach aufgetrennt, aus dem Gel auf eine Membran transferiert und durch Markierung mit entsprechenden Antikörpern für die Detektion visualisiert werden.<sup>173,174</sup>

Die Auftrennung der Proteine erfolgt entsprechend ihrer Molekulargewichte anhand des von Laemmli<sup>175</sup> entwickelten diskontinuierlichen elektrophoretischen Systems (SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gel)).<sup>173,174</sup>

Nach Auftrennung der Proteine wurden diese aus dem Gel auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran (s. Kap. 10.3.5) elektrophoretisch transferiert, wobei die Proteine hydrophobe und polare Interaktionen mit der Membranoberfläche eingingen.<sup>174</sup> Damit diese Wechselwirkungen gewährleistet werden konnten, musste zuvor die Hydrophobie der Membran durch die Äquilibration mit Ethanol gemindert werden (s. Kap. 10.3.5).<sup>174</sup> Die Immundetektion der einzelnen Proteine erfolgte dann über Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper.<sup>174</sup> Die beschriebene Vorgehensweise beruht auf Voruntersuchungen von Mandy Beyer (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Krämer, Institut für Toxikologie, Universitätsklinikum Mainz), die im Rahmen einer Kooperation die Zell-Assays für die Verbindungen **13b**, **13c**, **13e**, **13f**, **13g** und Marbostat-2 (**39**) durchgeführt hat. Die detaillierte Beschreibung der verwendeten Materialien und angewandten Methoden für die zelluläre Testung ist in Kap. 10.3 zu finden.

### 5.1.4 Untersuchung der Selektivität und inhibitorischen Aktivität der synthetisierten HDAC6-Inhibitoren

Wie im Rahmen der enzymatischen Testung erläutert (s. Kap. 4.2), hemmt ein Großteil der synthetisierten Verbindungen das Target-Enzym HDAC6 bereits im nanomolaren bzw. subnanomolaren Bereich. Diese inhibitorische Fähigkeit sollte im zellulären Testsystem über die Detektion von akkumulierten HDAC6-Substraten gemessen werden (s. Kap. 1.3.2).

HDAC6 entacetyliert eine Vielzahl verschiedener zytosolischer Substrate, wie  $\alpha$ -Tubulin, HSP 90<sup>176</sup>,  $\beta$ -Catenin<sup>177</sup>, AKT<sup>178</sup>, Cortactin<sup>13</sup> und Peroxiredoxin<sup>13</sup> (s. Kap. 1.3.2). Als verlässlicher Marker für die HDAC6-Inhibition wird die Hyperacetylierung von

$\alpha$ -Tubulin herangezogen, da das zytoplasmatische HDAC6-Enzym  $\alpha$ -Tubulin in den Zellen als Target umgesetzt.<sup>179</sup> Daher wurde dieser Surrogat-Parameter<sup>180</sup> zur Bestimmung der inhibitorischen Potenz der Testverbindungen gewählt.

Zur Evaluierung der Isoenzym-Aktivität wurde das nukleäre Protein ac-H3 gewählt, da dieses Histon *in vivo* kein Substrat der HDAC6 ist.<sup>44,180,181</sup> Demnach sollte eine spezifische HDAC6-Inhibition keinerlei Effekt auf den Hyperacetylierungsstatus aufweisen. Im Gegensatz dazu wird ac-H3 von den zur Klasse I gehörenden HDAC-Isoformen (HDAC1-3) entacetyliert, weswegen MS-275 (**6**), ein Inhibitor von HDAC1-3 als Negativkontrolle verwendet wurde.<sup>180,182</sup> Für die Gewährleistung einer aussagekräftigen ac-H3-Anreicherung, musste die Negativkontrolle in einer Konzentration von 5  $\mu$ M eingesetzt werden.<sup>183</sup>

HSP 90 wurde als Ladekontrolle verwendet, da das Hitzeschockprotein bis zu 2 % des Gesamtproteins einer Zelle ausmacht und demnach gut nachweisbar ist.<sup>174,184</sup> Ladekontrollen dienen im Allgemeinen dazu, zu prüfen, ob eine gleichmäßige Auftragung der Proteinmenge erfolgt ist. Des Weiteren ist das Protein HSP 90, unabhängig von der verwendeten Zelllinie als Ladekontrolle einsetzbar, da es in allen Zellen vorkommt und in den meisten Fällen nicht reguliert wird.<sup>174,184</sup> Zudem hat es eine geeignete Größe für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche, da Proteine als Ladekontrolle gewählt werden müssen, die ein stark abweichendes Molekulargewicht besitzen als das der zu erforschenden Proteine.<sup>174,184</sup> Demnach wäre beispielsweise  $\beta$ -Aktin (45 kDa) als Ladekontrolle ungeeignet, da die Bande der Ladekontrolle nur schwierig vom  $\alpha$ -Tubulin (55 kDa) zu unterscheiden wäre.<sup>184</sup> Die Detektion von HDAC6 diene dem Nachweis, dass das Target-Enzym trotz Inhibition nicht abgebaut wurde.

Die Tatsache, dass die HDAC-Isoformen sich in ihren Target-Proteinen unterscheiden und die Anzahl an spezifischen HDACi zunimmt, eröffnet die Möglichkeit, zwischen den Aktivitäten verschiedener HDACs zu differenzieren und damit die spezifische Inhibition mittels Western Blot zu beurteilen.<sup>174</sup>

Aufgrund der hohen Relevanz von HDAC6 in hämatopoetischen Stammzellen wurden diese für die Durchführung der Zell-Assays verwendet.<sup>179</sup>

Um strukturelle Merkmale zu definieren, die für einen potenten HDAC6i *in vivo* entscheidend sind, wurden MV4-11 Zellen mit allen in Kap. 3.1-3.7 vorgestellten Verbindungen für 24 Std inkubiert. Bei den MV4-11 Zellen handelt sich um eine exponentiell wachsende humane Zelllinie vom Phänotyp B der Myelomen Leukämie.<sup>185</sup>

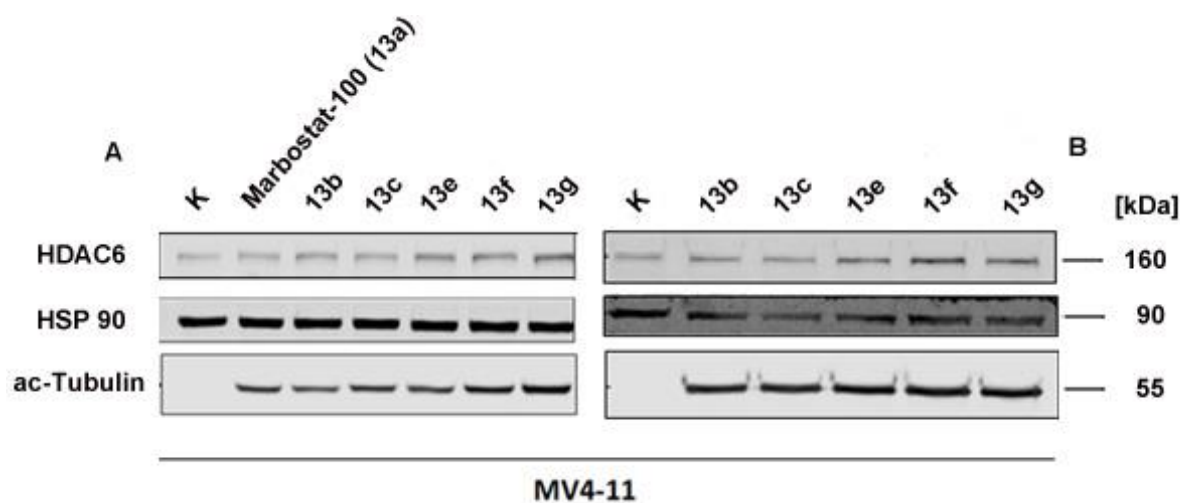
Die biologisch aktiven Moleküle wurden nicht nach ihren Kopfgruppen sortiert im zellulären Assay getestet, sondern entsprechend den gewonnenen Erkenntnissen aus dem rekombinanten HDAC6-Enzym-Assay. Aufgrund der ausgeprägten inhibitorischen Aktivität von **13a** im enzymatischen System, wurden Potenz und Selektivität aller weiteren synthetisierten Verbindungen stets in Vergleich dazu gesetzt.

## 5.2 Ergebnisse

### 5.2.1 Zelluläre Untersuchung von 13a-c, 13e-g und 39.

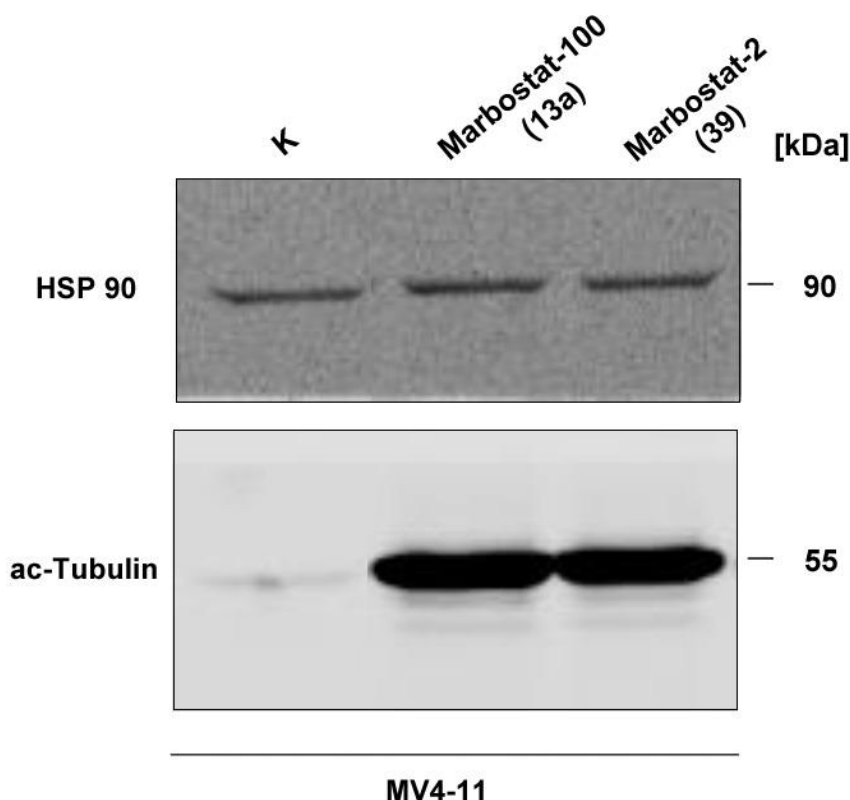
Zunächst sollte untersucht werden, ob Substitutionen an der Position 7 bzw. 8 der Indol-Partialstruktur auch im komplexeren zellulären System zu keinen Einschränkungen der inhibitorischen Wirksamkeit führen (s. **Abb. 5.3**). Voruntersuchungen, die im Rahmen einer Kooperation von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Krämer durchgeführt wurden, ergaben, dass eine Konzentration von 200 nM für den überwiegenden Teil der synthetisierten Verbindungen eine geeignete Konzentration darstellt, um die Auswirkungen der Enzymhemmung im zellulären Assay zu messen. Liegen höheren Konzentrationen vor, kommt es aufgrund der starken Potenz von **13a** zu einer Überstrahlung, wodurch eine Auswertung nicht mehr möglich ist.

Die in **Abb. 5.3 A** vorgestellten Verbindungen **13b-c**, **13e-g**, wurden jedoch in einer Konzentration von 50 nM eingesetzt, da eine Messung im Vorfeld mit höherer Konzentration (hier anhand von 500 nM gezeigt, **Abb. 5.3 B**) keine Differenzierung zwischen den einzelnen Testverbindungen in Bezug auf ihre inhibitorische Stärke zuließ. Betrachtung der **Abb. 5.3 A** zeigt, dass durch die Einführung raumeinnehmender Substituenten, wie im Fall von **13b**, **13c** und **13e**, die biologische Aktivität nicht eingeschränkt und demnach eine Substitution an der Indol-Partialstruktur toleriert wird.



**Abb. 5.3.** Western Blot Ergebnisse von Marbostat (**13a**), **13b**, **13c**, **13e**, **13f** und **13g**. MV4-11 Zellen wurden 24 Std mit den verschiedenen potenziellen HDAC6i [50 nM (A) bzw. 500 nM (B)] inkubiert. Die Entwicklung der Membranen erfolgte durch Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper (Immunodetektion) und wurde von Mandy Beyer durchgeführt. Als Ladekontrolle wurde HSP 90 verwendet, während ac-Tubulin als Surrogat-Parameter diente. DMSO diente als Kontrolle (K).

Zusätzlich zu den vorgenommenen Derivatisierungen an Position 7 und 8 der Indol-Partialstruktur wurde im Rahmen der Untersuchung der Kopfgruppe 1 die Hydantoin-Partialstruktur durch eine Methylengruppe zu einer homologen Hydantoin-Partialstruktur (Kopfgruppe 2) erweitert. Wie schon im Enzym-Assay gezeigt, konnte für **39** eine ähnlich starke ac-Tubulin-Bande wie für **13a** detektiert werden. Aus dieser Beobachtung lässt sich schlussfolgern, dass unter Beibehaltung des Marbostat-100-Grundkörpers der Einbau einer Methylengruppe in die Hydantoin-Partialstruktur die inhibitorische Wirkung nicht verschlechtert. Die Enzym-Inhibitionsdaten veranschaulichen, dass **39** eine geringfügig schlechtere HDAC-Isoenzym-Selektivität (gegenüber HDAC2 und HDAC8) im Vergleich zu Marbostat-100 (**13a**) aufweist.



**Abb. 5.4.** Western Blot Ergebnisse von Marbostat (**13a**) und **39**. MV4-11 Zellen wurden für 24 Std mit verschiedenen potenziellen HDAC6i [100 nM] inkubiert. Die Entwicklung der Membranen erfolgte durch Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper (Immunodetektion) und wurde von Mandy Beyer durchgeführt. Als Ladekontrolle wurde HSP 90 verwendet, während ac-Tubulin als Surrogat-Parameter diente. DMSO diente als Kontrolle (K).

### 5.2.2 Zelluläre Untersuchung von **13d**, **13h**, **74a** und **74b**

Nachdem im enzymatischen und zellulären Testsystem gezeigt werden konnte, dass apolare Alkyloxyketten zu keiner Minderung der Inhibition gegenüber HDAC6 beitrugen, sollte im Hinblick auf das Löslichkeitsverhalten überprüft werden, wie der Einfluss von polaren funktionellen Gruppen auf die inhibitorische Potenz einzuordnen ist (s. **Abb. 5.5**). Das 8-Hydroxy-Derivat **13d** führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer erhöhten Hyperacetylierung des  $\alpha$ -Tubulins, die jedoch leicht schwächer ausfiel als die von Marbostat-100 (**13a**). Da nur der Inhibitor MS-275 (**6**) zu einer Anreicherung des nukleären Substrates ac-H3 führte, konnte damit belegt werden, dass die OH-Substitution an der Indol-Partialstruktur nicht zu einer Selektivitätsabnahme beitrug.

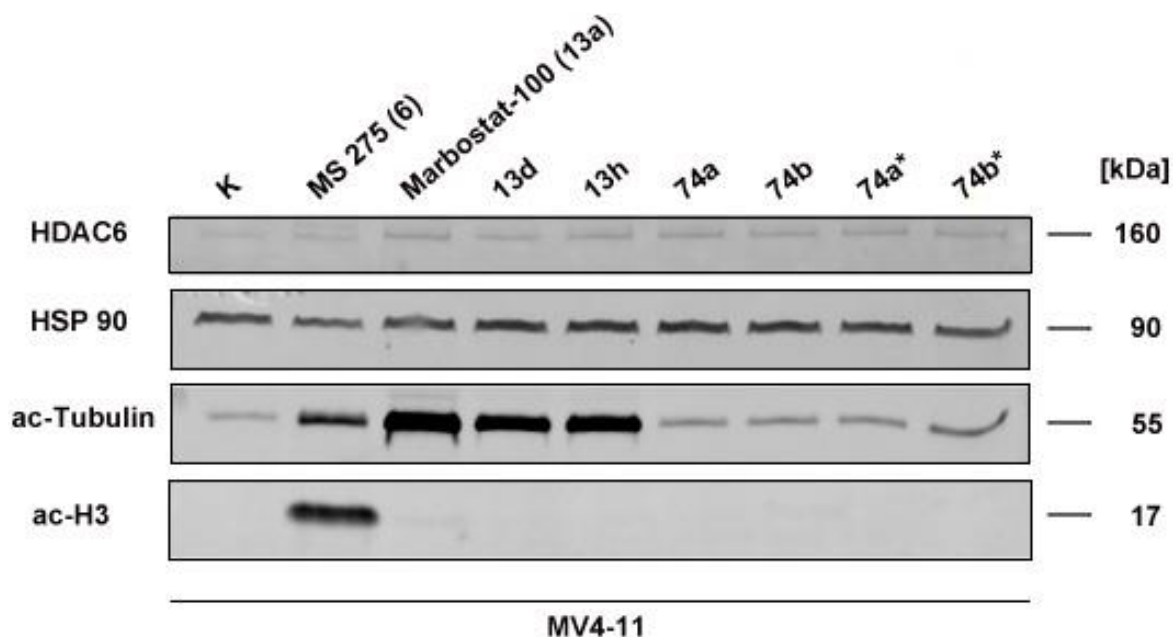
Da weder größere Benzyloxy- noch polare Reste an der Position 8 der Indol-Partialstruktur zu einer deutlichen Einschränkung der biologischen Aktivität führten, war davon auszugehen, dass das wasserlösliche Derivat **13h** ebenfalls zu einer guten Hemmwirkung im zellulären System führt.

Wie in **Abb. 5.5** gezeigt, bewirkte das Morpholin-Derivat **13h** eine Akkumulation von ac-Tubulin, wobei diese Proteinbande gegenüber **13d** deutlich verstärkt war und gegenüber **13a** zu einer vergleichbaren bzw. leicht schwächeren Hyperacetylierung führte.

Der im Zuge des „Scaffold Hoppings“ (s. Kap. 3.6.1) durchgeführte Austausch des Grundkörpers (Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-Grundstruktur  $\rightarrow$  Histidin-Substruktur) führte zu den Verbindungen **74a** und **74b**. Beide Verbindungen zeigten in Übereinstimmung mit den im Enzym-Assay erhaltenen Daten (s. Kap. 4.2.2; **Tab. 4.3**) keine verstärkte ac-Tubulin-Bande.

Um zu prüfen, ob ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle erzielt werden konnte, wurden **74a** und **74b** zusätzlich in einer Konzentration von 500 nM getestet. Dies führte jedoch zu keiner gesteigerten Anreicherung von ac Tubulin (s. **Abb. 5.5**), womit diese Substanzen als potenzielle HDAC6i ausgeschlossen werden können.

Gemeinsam ist allen synthetisierten Verbindungen, dass es zu keiner Erhöhung der ac-H3-Konzentration kam, sodass unselektive Effekte ausgeschlossen werden konnten.



**Abb. 5.5.** Western Blot Ergebnisse von Marbostat-100 (**13a**), **13d**, **13h**, **74a** und **74b**. MV4-11 Zellen wurden für 24 Std mit den verschiedenen potenziellen HDAC6i [200 nM bzw. \*500 nM] und der Negativkontrolle MS-275 (**6**, 5  $\mu$ M) inkubiert. Die Entwicklung der Membranen erfolgte durch Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper (Immunodetektion). Als Ladekontrolle wurde HSP 90 verwendet, während ac-Tubulin als Surrogat-Parameter diente. Ac-H3 wurde zur Evaluierung der Selektivität herangezogen. DMSO diente als Kontrolle (K).

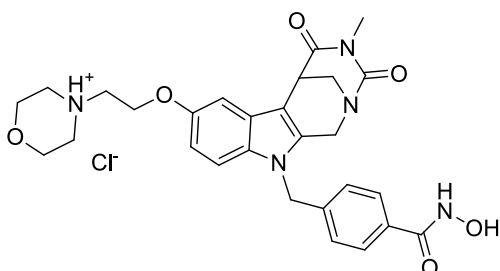
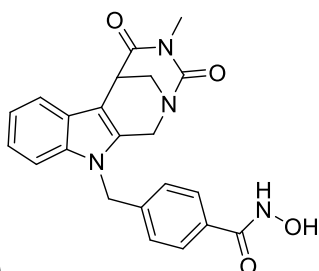
### 5.2.3 Bestimmung der Wasserlöslichkeit von **13h**

Wie bereits in Kap. 3.1 beschrieben, sollte durch die Einführung des Morpholin-Restes an der Position 8 der Indol-Partialstruktur die Löslichkeit der Leitverbindung **13a** gesteigert werden. Inwiefern eine Verbesserung gewährleistet werden konnte, sollte experimentell grob eingeordnet werden.

Die Bestimmung der Wasserlöslichkeit erfolgte in Anlehnung an die von den OECD-Richtlinien<sup>186</sup> definierte Vorgehensweise und wird in Kap 10.4 detailliert beschrieben.

Diese Richtlinien ermöglichen es, im Rahmen einer Voruntersuchung die notwendige Menge der Testsubstanz abzuschätzen, die für weiterführende Testungen benötigt wird, sowie die Zeit zu evaluieren, der es bedarf, bis eine Sättigung der Lösung eintritt. Im Fall von **13h** waren 0,5 mL H<sub>2</sub>O für die Löslichkeit von 0,1 g Substanz notwendig, während bei Marbostat-100 (**13a**) die Menge an H<sub>2</sub>O für die gleiche Substanzmenge > 100 mL betrug (s. **Tab. 5.1**). Damit konnte belegt werden, dass die Substitution des Morpholin-Restes an die Grundstruktur des Marbostat-100 die Löslichkeit in H<sub>2</sub>O deutlich verbessert.



Verbindung	Löslichkeit in Wasser
<p><b>13h</b></p> 	200-1000 g/L
<p><b>Marbostat-100 (13a)</b></p> 	<1 g/L

**Tab. 5.1.** Vergleich der Wasserlöslichkeit von **13h** mit der Leitverbindung Marbostat-100 (**13a**) entsprechend den OECD-Richtlinien.<sup>186</sup> Obwohl die SI-Einheit für die Wasserlöslichkeit kg / m<sup>3</sup> ist, ist die Einheit g / L gebräuchlicher und wird daher auch in diesem Fall verwendet.

#### 5.2.4 Zelluläre Untersuchung von **49**, **61** und **65**

Die im Folgenden besprochenen Verbindungen weisen einen zu Tubastatin A (**10**) ähnlichen Grundkörper mit einem zusätzlichen D-Ring auf. Bei **49** liegt der D-Ring in Form einer angular anellierten Hydantoin-Partialstruktur vor. Dieses Derivat demonstrierte im Gegensatz zu den deutlich schwächeren Enzym-Inhibitions-Daten eine moderate Akkumulation von ac-Tubulin in Bezug auf die Leitverbindung **13a** (s. **Abb. 5.6**).

Trotz der viermal besseren Enzym-Inhibitionsdaten von **61** gegenüber **49** zeigten diese Verbindungen im zellulären Assay als HDAC6i vergleichbare Potenz. Der anhand der Enzym-Inhibitionsdaten vermutete sterische Einfluss des annelierten D-Ringes von **49** scheint im komplexeren zellulären System im direkten Vergleich mit **61** keinen nachteiligen Effekt auf die biologische Aktivität auszuüben. Bei einem Vergleich mit **13a** zeigte sich jedoch, dass über die Ausrichtung des D-Ringes die inhibitorische Potenz gesteuert werden kann, da sie letztlich darüber bestimmt, wie gut der Inhibitor in die aktive Bindungstasche des Target-Enzyms passt.

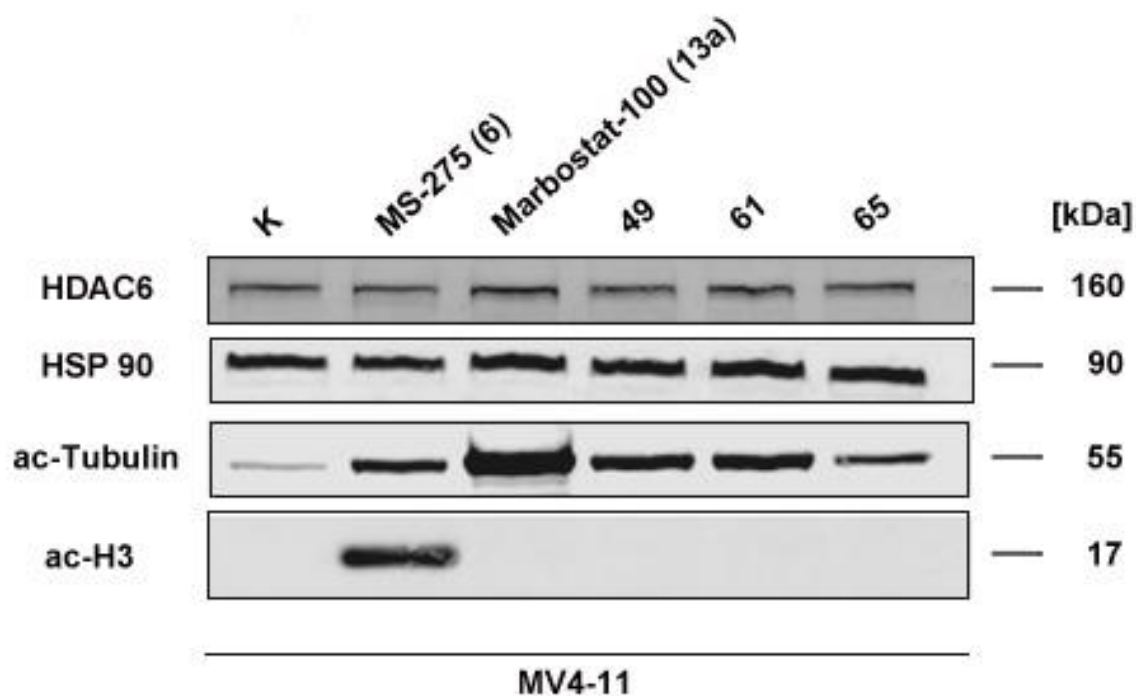
Eine deutliche Aktivitätsabnahme ist für die Verbindung **65** zu verzeichnen, welche sich durch eine zusätzliche Methylengruppe im D-Ring von **61** unterscheidet. Die deutlich schwächere ac-Tubulin-Bande im Vergleich zu den anderen auf der Blot-Membran dargestellten Substanzen verdeutlicht, dass der Einbau der Methylengruppe in die Hydantoin-Partialstruktur (D-Ring; homologe Hydantoin-Partialstruktur) die Wirkung abschwächt.

Da bei allen in **Abb. 5.6** vorgestellten Verbindungen eine inhibitorische Wirkung auf die Hyperacetylierung des Tubulins feststellbar war, musste die anhand der Enzym-Inhibitionsdaten getätigte Aussage über die Bedeutung der Grundstruktur wie folgt ergänzt werden (s. Kap. 4.2.2).

Fasst man die enzymatischen und zellulären Ergebnisse der Verbindungen mit dem Tetrahydro- $\gamma$ -carbolin-Grundkörper (**61**, **65**) zusammen, so lässt sich ableiten, dass dieser Austausch des Grundkörpers nicht zu einem kompletten Wirkungsverlust, wie im Fall von **74a** und **74b** führt. Ein Vergleich mit der Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-Struktur (Marbostat-100, **13a**) demonstriert jedoch eine Wirkungsabnahme, womit der Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-Grundkörper im direkten Vergleich überlegen ist. Damit kann diesem Grundkörper eine entscheidende Bedeutung bezüglich der inhibitorischen Potenz zugesprochen werden.

In Bezug auf die Selektivität lassen sich zwischen Kopfgruppe 3 (**49**), Kopfgruppe 4 (**61**) und Kopfgruppe 5 (**65**) keine Unterschiede feststellen, da bei keiner der Verbindungen eine Bande sichtbar war, die auf eine ac-H3 Erhöhung hinwies.

Abschließend ist festzuhalten, dass, trotz guter Hemmwirkung gegenüber HDAC6, dieses Enzym, wie **Abb. 5.6** zeigt, nicht abgebaut wird.



**Abb. 5.6.** Western Blot Ergebnisse von Marbostat-100 (**13a**), **49**, **61**, **65**. MV4-11 Zellen wurden für 24 Std mit den verschiedenen potenziellen HDAC6i [200 nM] und der Negativkontrolle MS-275 (**6**, 5  $\mu$ M) inkubiert. Die Entwicklung der Membranen erfolgte durch Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper (Immunodetektion). Als Ladekontrolle wurde HSP 90 verwendet, während ac-Tubulin als Surrogat-Parameter diente. Ac-H3 wurde zur Evaluierung der Selektivität herangezogen. DMSO diente als Kontrolle (K).

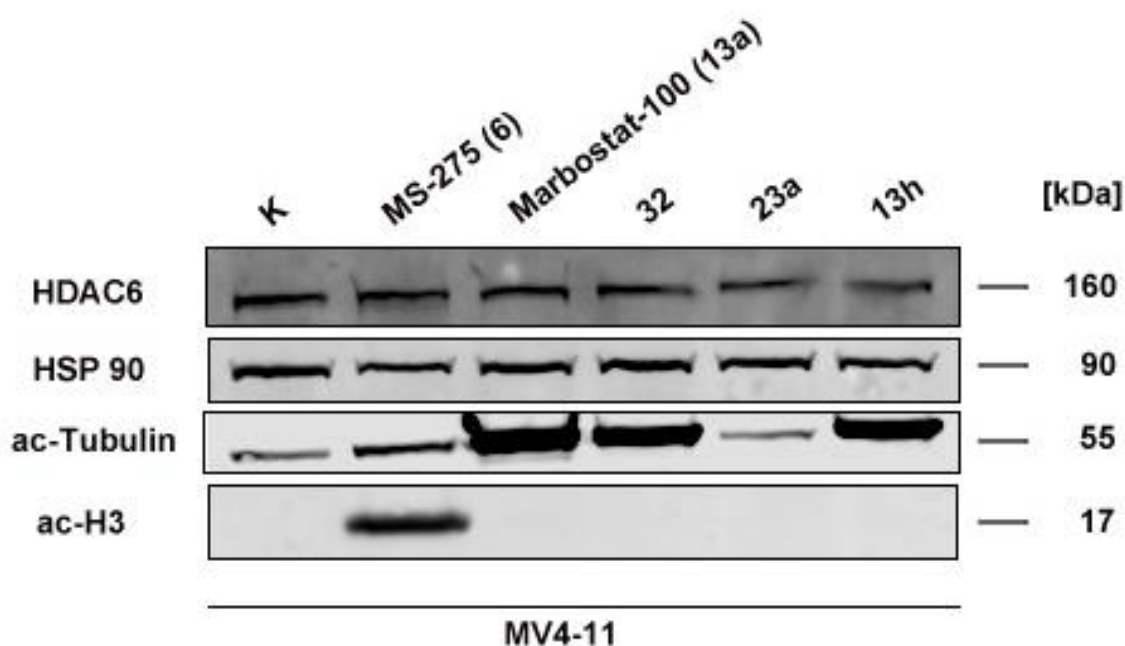
### 5.2.5 Zelluläre Untersuchung von **32**, **23a** und **13h**

Im nächsten Schritt sollten die im Zuge der Metabolisierungsstudie entstandenen Hydrolyseprodukte untersucht werden (s. Kap. 6.3.2). Obwohl diese Studie anhand von **13h** durchgeführt wurde, wurden für die enzymatische und zelluläre Testung die entsprechenden Hydrolyseprodukte (HP) (**32** stellvertretend für **31**, HP-1) und (**23a** stellvertretend für **23h**, HP-2) ausgehend vom Marbostat-100-Grundgerüst synthetisiert (s. Kap. 3.2) und jeweils in Relation zur Leitverbindung **13a** bzw. **13h** gesetzt (s. **Abb. 5.7**). Diese Herangehensweise ermöglichte es, weitere Informationen über die Struktur-Wirkungsbeziehung der Leitverbindung Marbostat-100 (**13a**) zu gewinnen.

Da Valproinsäure (**5**)<sup>14</sup> und Buttersäure<sup>14</sup> als erste entwickelte HDACi-Verbindungen (Potenz im millimolaren Bereich<sup>14</sup>) auch eine Carbonsäure-Einheit aufweisen, sollte die biologische Aktivität von **23a** zusätzlich zur enzymatischen Testung mittels Western Blot-Analyse verifiziert werden. Das Carbonsäure-Derivat **23a** zeigt eine ac-Tubulin-Bande

(s. **Abb. 5.7**), die vergleichbar mit der Kontrolle (DMSO) ist und unterstreicht damit das am rekombinanten Enzym gewonnene Ergebnis, dass dieses Derivat keine HDAC6-Hemmwirkung aufweist (vgl. Kap. 4.2.1; Tab. 4.1). Somit ist belegt, dass die Zink-chelatisierende Hydroxamsäure ein essentielles Strukturmerkmal für HDAC6i darstellt.

Bei Betrachtung von **32** fällt auf, dass die Öffnung des D-Ringes zu einer mit **13h** vergleichbaren HDAC6-Hemmung führt, während die Intensität der ac-Tubulin-Bande in Bezug zu Marbostat-100 (**13a**) nur geringfügig schwächer ausfällt. Daraus lässt sich ableiten, dass es aufgrund der inhibitorischen Aktivität von HP-2 trotz der Instabilität (< 5 %) des wasserlöslichen Derivates **13h** im biologischen System zu keinem Wirkungsverlust kommt. Diese Erkenntnis ist besonders in Hinblick auf *in vivo*-Studien von großer Bedeutung und soll in Zukunft näher evaluiert werden. Auch im Assay der Hydrolyseprodukte konnte keine ac-H3-Anreicherung festgestellt werden, womit es sich auch, besonders im Fall von **32** relevant, um einen selektiven HDAC6-Hemmer handelt.



**Abb. 5.7.** Western Blot Ergebnisse von Marbostat-100 (**13a**), **32**, **23a**, **13h**. MV4-11 Zellen wurden für 24 Std mit den verschiedenen potenziellen HDAC6i [200 nM] und der Negativkontrolle MS-275 (**6**, 5  $\mu$ M) inkubiert. Die Entwicklung der Membranen erfolgte durch Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper (Immunodetektion). Als Ladekontrolle wurde HSP 90 verwendet, während ac-Tubulin als Surrogat-Parameter diente. Ac-H3 wurde zur Evaluierung der Selektivität herangezogen. DMSO diente als Kontrolle (K).

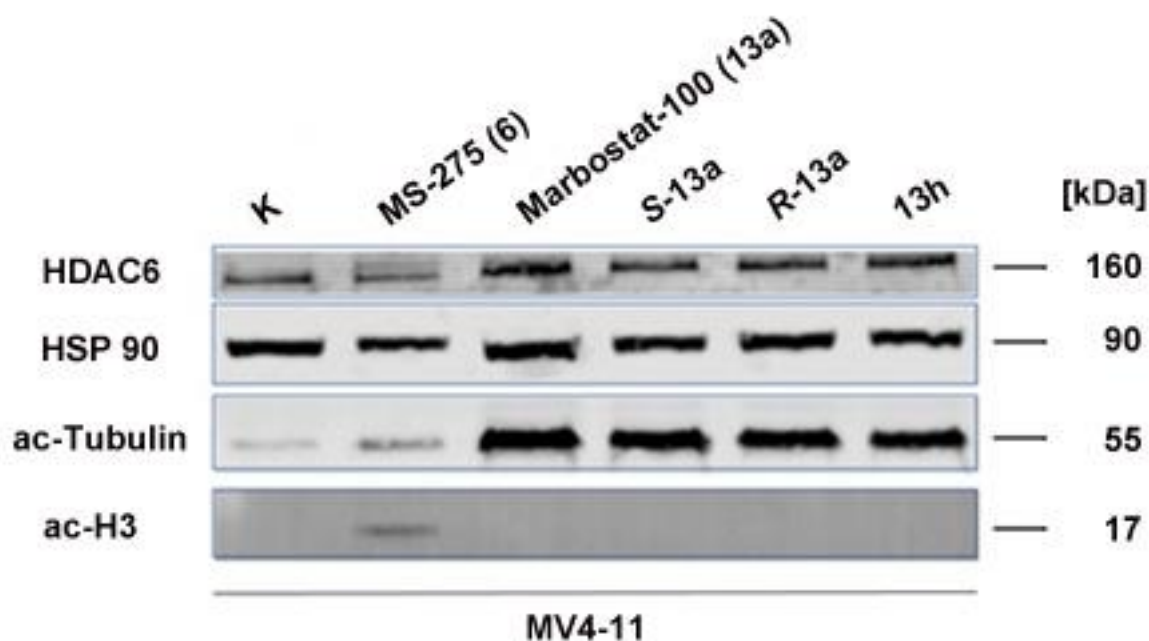
### 5.2.6 Zelluläre Untersuchung von *R*-13a und *S*-13a

Im folgenden Assay sollten die Enantiomere ***R*-13a** und ***S*-13a**, die Leitstruktur (**13a**) und das wasserlösliche Derivat **13h** in Hinblick auf die inhibitorische Potenz und Selektivität miteinander verglichen werden (s. **Abb. 5.8**).

Zunächst sollte der Einfluss der Stereochemie auf die inhibitorische Aktivität untersucht werden. Dabei fiel im Gegensatz zur enzymatischen Testung im komplexeren biologischen System der Unterschied in der inhibitorischen Wirkung, die durch die Enantiomere erhalten wurde, deutlich geringer aus.

***R*-13a** und ***S*-13a** weisen beide keine Bande für das nukleäre Substrat ac-H3 auf. Damit ist ausgeschlossen, dass eines der Enantiomere unselektive Effekte ausübt.

Die Verbindung **13h** wurde als Referenz mit aufgetragen, da dieses Derivat eine mit Marbostat-100 (**13a**) vergleichbare Potenz *in vitro* aufweist und als einziges Derivat aus der gesamten Reihe an Testverbindungen gut löslich in H<sub>2</sub>O ist (s. Kap. 5.2.3).



**Abb. 5.8.** Western Blot Ergebnisse von Marbostat (**13a**), ***S*-13a**, ***R*-13a** und **13h**. MV4-11 Zellen wurden für 24 Std mit den verschiedenen potenziellen HDAC6i [200 nM] und der Negativkontrolle MS-275 (**6**, 5  $\mu$ M) inkubiert. Die Entwicklung der Membranen erfolgte durch Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper (Immunodetektion). Als Ladekontrolle wurde HSP 90 verwendet, während ac-Tubulin als Surrogat-Parameter diente. Ac-H3 wurde zur Evaluierung der Selektivität herangezogen. DMSO diente als Kontrolle (K).

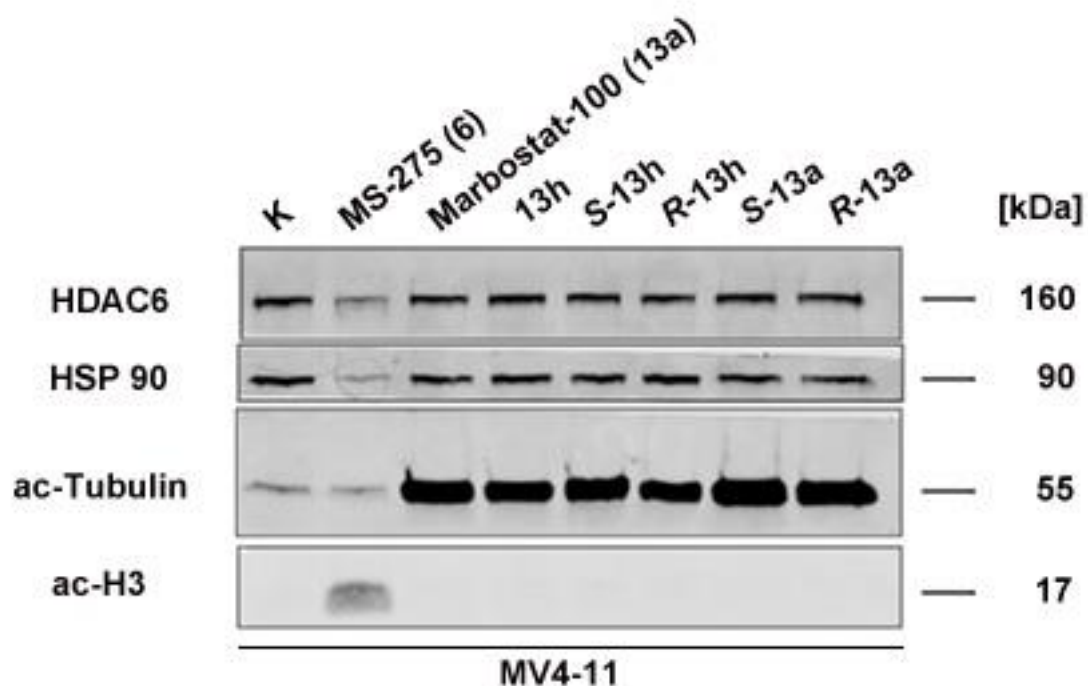
### 5.2.7 Zelluläre Untersuchung von **R-13a** und **S-13a**, sowie **R-13h** und **S-13h**

Nachdem die Bedeutung von **13h** in Kap. 5.2.3 beschrieben wurde, sollte im nächsten Schritt geprüft werden, ob sich die Beobachtungen aus dem enzymatischen System für die Enantiomere **R-13h** und **S-13h** auch auf das zelluläre System übertragen lassen (s. **Abb. 5.9**).

Hierbei konnten im Vergleich zu den Enantiomeren **R-13a** und **S-13a** (vgl. Kap. 5.2.6; **Abb. 5.8**) deutliche Aktivitätsunterschiede beobachtet werden. Während die ac-Tubulin-Anreicherung des *S*-Enantiomers mit dem der racemischen Verbindung **13h** vergleichbar ist, ist das *R*-Enantiomer durch eine schwächere, wenn auch weiterhin ausgeprägte HDAC6-Hemmwirkung charakterisiert. Demnach scheint das *S*-Enantiomer bessere Wechselwirkungen mit den Aminosäuren des aktiven Zentrums des Targets einzugehen und stellt damit, wie schon anhand der Enzym-Inhibitionsdaten beurteilt, das Eutomer dar, während es sich bei **R-13h** um das Distomer handelt.

Weiterhin ist anzumerken, dass in diesem Blot aufgrund der Hyperacetylierung des Tubulins ebenfalls eine vergleichbare inhibitorische Wirkung zwischen **R-13a** und **S-13a** in Bezug auf die racemische Verbindung **13a** zu erkennen ist.

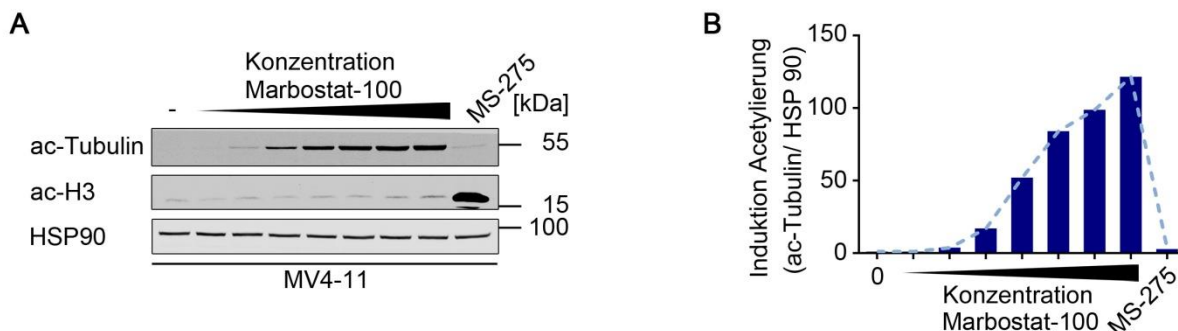
Bei allen 4 Enantiomeren (**R-13h**, **S-13h**, **R-13a** und **S-13a**) sowie den dazugehörigen racemischen Verbindungen **13h** und Marbostat-100 (**13a**) konnte keine Hyperacetylierung des nukleären Proteins ac-H3 festgestellt werden, sodass auch für die Enantiomere **R-13h** und **S-13h** nicht mit unselektiven Effekten zu rechnen ist.



**Abb. 5.9.** Western Blot Ergebnisse von Marbostat (**13a**), **13h**, **S-13h**, **R-13h**, **S-13a** und **R-13a**. MV4-11 Zellen wurden 24 Std mit den verschiedenen potenziellen HDAC6i [200 nM] und der Negativkontrolle MS-275 (**6**, 5 μM) inkubiert. Die Entwicklung der Membranen erfolgte durch Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper (Immunodetektion). Als Ladekontrolle wurde HSP 90 verwendet, während ac-Tubulin als Surrogat-Parameter diente. Ac-H3 wurde zur Evaluierung der Selektivität herangezogen. DMSO diente als Kontrolle (K).

### 5.2.8 Konzentrations-Wirkungs- und Kinetik-Studie im HDAC6-Inhibitons-Assay

Die Daten, die im Rahmen der enzymatischen und zellulären Testung gewonnen wurden, veranschaulichen, dass Marbostat-100 (**13a**) ein selektiver HDAC6i mit ausgeprägter inhibitorischer Potenz ist. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf der Fokus auf diese Verbindung gerichtet. Die Durchführung der folgenden Blots sowie die graphische Auswertung wurden im Rahmen einer Kooperation von Mandy Beyer (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Oliver Krämer, Institut für Toxikologie, Universitätsklinikum Mainz) übernommen. Die dabei verwendeten Methoden werden in Kap. 10.5 kurz erläutert.



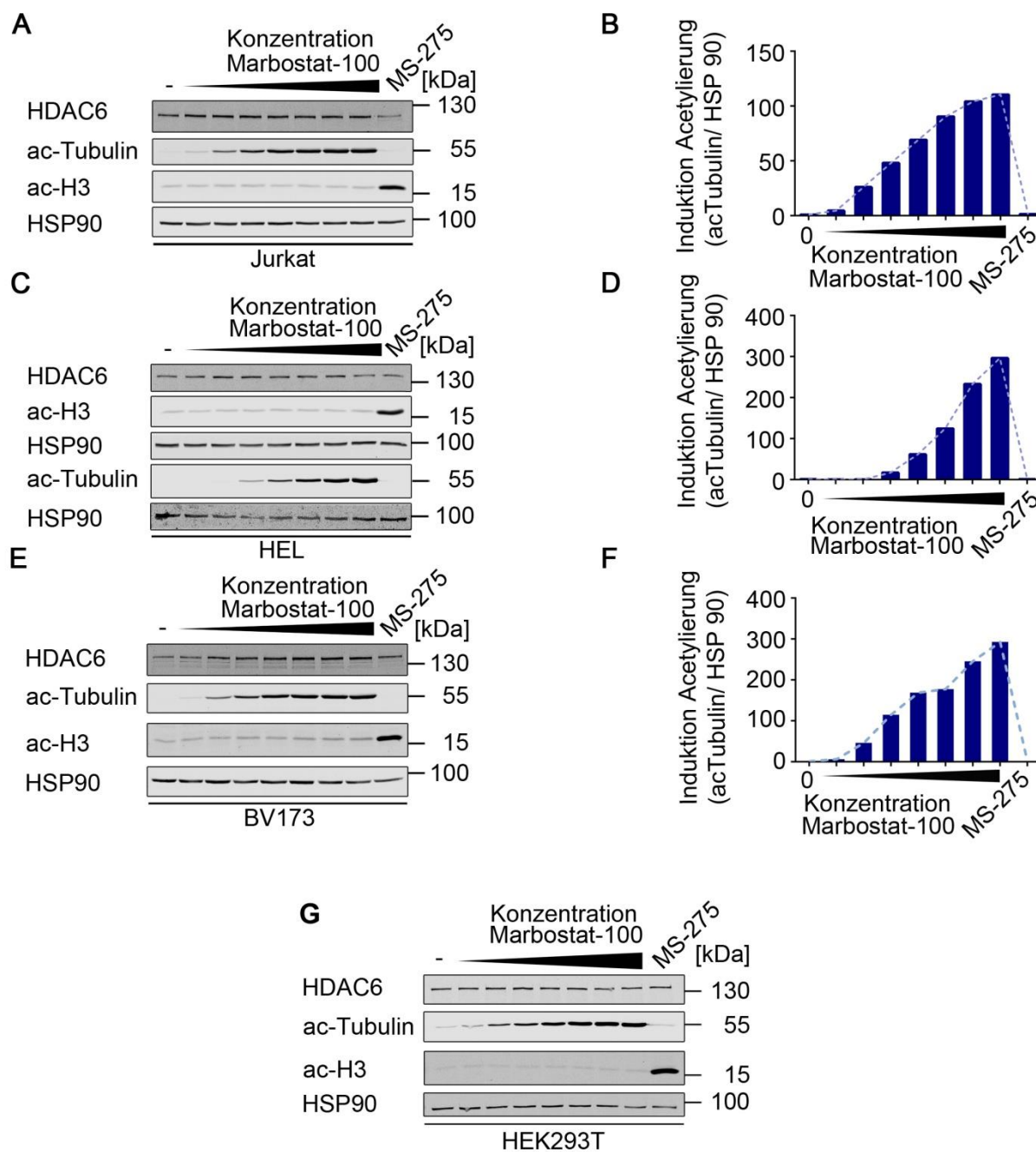
**Abb. 5.10.** Evaluierung der inhibitorischen Potenz von Marbostat-100 (**13a**). (A) MV4-11 Zellen wurden mit 5, 20, 50, 100, 250, 500 und 1000 nM Marbostat-100 (**13a**) oder mit 5 µM MS-275 (**6**) für 24 Std inkubiert. (B) Densitometrische Analyse von ac-Tubulin / HSP 90. DMSO diente als Vergleichskontrolle (-). Die abgebildeten Grafiken wurden von Mandy Beyer erstellt.

Zunächst sollte analysiert werden, inwieweit die von Marbostat-100 (**13a**) hervorgerufene Inhibition der HDAC6 konzentrationsabhängig ist und die wirksame Dosis ermittelt werden. Dafür wurden MV4-11 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an **13a** (5 nM bis 1 µM) für 24 Std inkubiert. Als Negativkontrolle diente wieder der HDAC 1-3 Inhibitor MS-275 (**6**), der in der bekannten Konzentration (5 µM) eingesetzt wurde.

Bereits bei einer Konzentration von 20 nM konnte eine leicht stärkere Intensität der ac-Tubulin-Bande im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden, die damit die ausgeprägte Affinität von Marbostat-100 (**13a**) zum Target-Enzym (HDAC6) veranschaulicht (s. **Abb. 5.10** (A)). Ab einer Konzentration von 50 nM **13a** ist eine deutliche Hyperacetylierung des Tubulins festzustellen, welche mit steigender Konzentration sukzessive zunimmt. Bei einem Vergleich dieser Daten mit jenen, die beim biochemischen Fluoreszenz Assay (vgl. Kap. 4.2.1; **Tab. 4.1**) erzielt wurden, lässt sich feststellen, dass zwischen der Effektivität von **13a** am rekombinanten Enzym und jener im zellulären Assay ein rund zehnfacher Unterschied vorliegt.<sup>57</sup> Solche Differenzen zwischen enzymatischen und zellulären Ergebnissen sind typisch und konnten beispielsweise auch für hoch potente Tyrosinkinase-Inhibitoren, sowie für den pan-HDACi TSA (**2**) beobachtet werden.<sup>39,57</sup>

**Abb. 5.10** (B) zeigt das Ergebnis der densitometrischen Analyse des Blots von **Abb. 5.10** (A), welche dazu dienen soll, die Hyperacetylierung des  $\alpha$ -Tubulins im Vergleich zur Ladekontrolle HSP 90 zu quantifizieren.<sup>184</sup> Hierbei konnte die bereits im Western Blot anhand des Surrogat-Parameters gezeigte inhibitorische Aktivität in Form von Säulendiagrammen bestätigt werden. Damit lässt sich zusätzlich ein Zusammenhang zwischen steigender Konzentration an **13a** und zunehmender Hyperacetylierung des HDAC6-Substrates belegen.

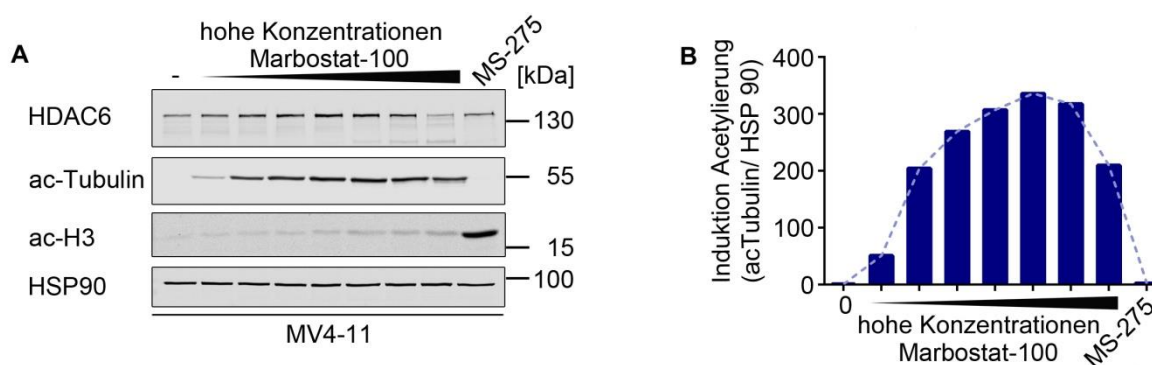




**Abb. 5.11.** Evaluierung der inhibitorischen Potenz von Marbostat-100 (**13a**) in humanen Leukämie-Zelllinien. (A) Jurkat, (C) HEL, (E) BV173 und die humane embryonale Nieren-Zelllinie (G) HEK293T wurden mit steigenden Konzentrationen an Marbostat-100 (**13a**) (5, 20, 50, 100, 250, 500 und 1000 nM) oder mit 5  $\mu$ M MS-275 (**6**) für 24 Std inkubiert. Die biologischen Effekte wurden mittels Western Blot-Analyse bestimmt. (B), (D), (F), zeigen die Ergebnisse der densitometrischen Analysen der Blots (A, C, E). DMSO diente als Kontrolle (-). HSP 90 diente als Ladekontrolle. Die abgebildeten Grafiken wurden von Mandy Beyer erstellt.

Um Zelltyp-abhängige Effekte auszuschließen, wurde Marbostat-100 (**13a**) zusätzlich in den humanen Leukämie-Zelllinien Jurkat, HEL und BV 173, sowie in der humanen embryonalen Nieren-Zelllinie HEK293T auf seine biologische Aktivität hin untersucht (s. **Abb. 5.11**). Wie bereits für MV4-11 Zellen beobachtet, konnte auch bei Verwendung von Jurkat, BV173 und HEK293T Zellen (s. **Abb. 5.11** (A), (E) und (G)) bereits bei einer Konzentration von 20 nM eine geringfügige Zunahme der Tubulin-Peracetylierung im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden.<sup>57</sup> Gemeinsam ist allen untersuchten Zelllinien, dass ab einer Konzentration von 50 nM eine deutliche Hemmwirkung sichtbar ist (s. **Abb. 5.11** (A), (C), (E) und (G)) sowie **Abb. 5.10** (A)).<sup>57</sup>

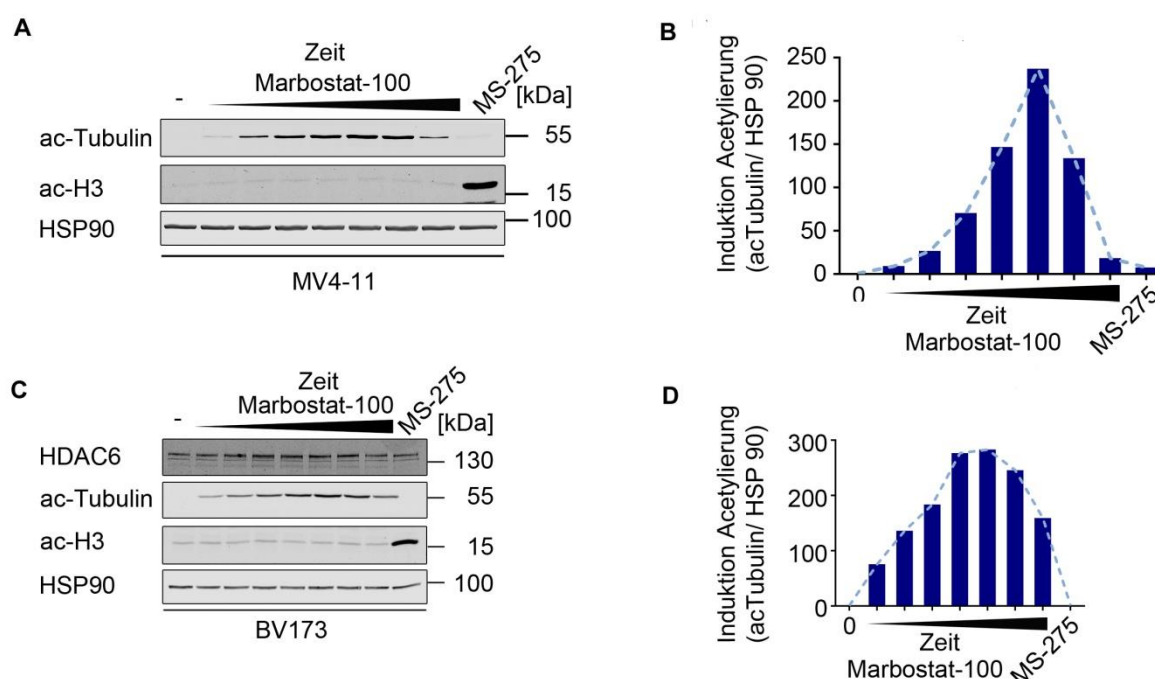
Die in diesen Systemen gesammelten Ergebnisse bestätigen, dass es sich bei Marbostat-100 (**13a**) um einen HDAC6i im nanomolaren Konzentrationsbereich handelt.<sup>57</sup>



**Abb. 5.12.** Evaluierung des biologischen Effektes von Marbostat-100 (**13a**) in höheren Konzentrationen. (A) MV4-11 Zellen wurden mit 0,05, 0,5, 1, 2, 4, 5 und 10 µM **13a** oder mit 5 µM MS-275 (**6**) für 24 Std inkubiert. (B) Darstellung der densitometrischen Analyse von ac-Tubulin / HSP 90 bezogen auf die Ergebnisse von Blot (A). DMSO diente als Vergleichskontrolle (-). Die abgebildeten Grafiken wurden von Mandy Beyer erstellt.

Wie aus **Abb. 5.10** (B) hervorgeht, wurde noch kein Plateau der Wirkung bei einer Konzentration von 1 µM Marbostat-100 (**13a**) erreicht. Aus diesem Grund sollte im nächsten Schritt der Effekt, den **13a** in höheren Konzentrationen auf die HDAC6-Inhibition ausübt, bestimmt werden. Dafür wurden MV4-11 Zellen mit **13a** in einem Konzentrationsbereich von 50 nM bis 10 µM für 24 Std inkubiert. Die Lysate dieser Zellen wurden auf den Acetylierungsstatus des Tubulins hin untersucht (s. **Abb. 5.12** (A) und (B)). Dabei konnte für alle getesteten Konzentrationen eine Akkumulation von ac-Tubulin ermittelt werden. Bei einem Vergleich mit dem HDAC1-3 Inhibitor MS-275 (**6**) ist jedoch hervorzuheben, dass **13a** selbst in hohen Konzentrationen keine Anreicherung des ac-H3 Proteins bewirkt und demnach als ein sehr selektiver HDAC6i bezeichnet werden kann (s. **Abb. 5.12** (A)).<sup>57</sup>

Bei Betrachtung der HDAC6-Bande (s. **Abb. 5.12 (A)**) fällt auf, dass bei der höchsten Konzentration (10  $\mu$ M) die Intensität der Bande abnimmt, woraus abgeleitet werden kann, dass es zu einem Zerfall des Target-Enzyms kommt.<sup>57</sup> Dieser Effekt führt nicht zu einer weiteren Steigerung der Acetylierung des Tubulins (s. **Abb. 5.12 (A) und (B)**).<sup>57</sup> Aufgrund dieser Beobachtung kann angenommen werden, dass HDAC6 bereits vor der Degradation durch Marbostat-100 (**13a**) vollständig blockiert ist und deswegen keinerlei Auswirkungen auf die ac-Tubulin-Bande im Blot zu erkennen sind.



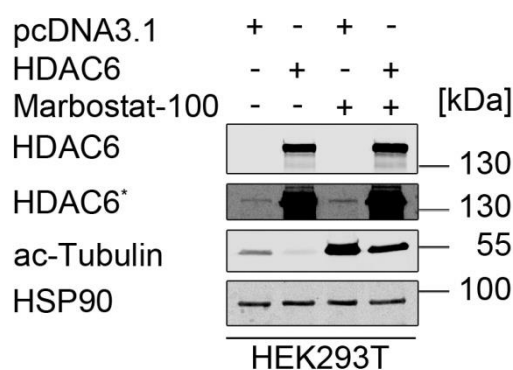
**Abb. 5.13.** Darstellung der Ergebnisse der Kinetik-Studie der Leitverbindung **13a**. (A) MV4-11 Zellen wurden für 10–30 min, 1, 2, 16, 24, und 48 Std mit 50 nM Marbostat-100 (**13a**) oder für 24 Std mit 5  $\mu$ M MS-275 (**6**) inkubiert. (B) Densitometrische Analyse von ac-Tubulin / HSP 90 ausgehend vom Blot (A). (C) BV173 Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (10 min, 30 min, 1 Std, 2 Std, 16 Std, 24 Std und 48 Std) mit 50 nM **13a** oder mit 5  $\mu$ M MS-275 (**6**) für 24 Std inkubiert. Die Hyperacetylierung des Tubulins wurde mit der Ladungskontrolle HSP 90 durch Densitometrie bestimmt (D). DMSO diente als Kontrolle (-). Die abgebildeten Grafiken wurden von Mandy Beyer erstellt.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass 50 nM Marbostat-100 (**13a**) eine deutliche Hyperacetylierung des Tubulins induziert, sollte evaluiert werden, wie lange der Effekt anhält und ab wann dieser einsetzt. Daher wurde im Anschluss **13a** einer Kinetik-Studie unterzogen. Dafür wurden MV4-11 Zellen mit 50 nM **13a** für mindestens 10 min bis maximal 48 Std inkubiert. Die Leitverbindung **13a** zeigt bereits nach 30 min eine inhibitorische Aktivität, die ausgehend von der Tubulin-Acetylierung nach 16 Std ihr Maximum erreicht (s. **Abb. 5.13 (A) und (B)**).<sup>57</sup>

Bei einem Vergleich der inhibitorischen Wirksamkeit (bezogen auf HDAC6) von MS-275 (**6**) nach 24 Std entspricht diese in etwa der Wirksamkeit, die Marbostat-100 (**13a**) nach 10 min entfaltet. Dies ist ungefähr 25-fach geringer als jene, die nach 24 Std durch **13a** hervorgerufen wird (s. **Abb. 5.13** (A) und (B)).<sup>57</sup> Wie bereits bei der Konzentrations-Wirkungsstudie (s. Kap. 5.2.8) gezeigt, konnte auch bei der Kinetik-Studie keine ac-H3 Anreicherung detektiert werden, so dass auch mit zunehmender Inkubationsdauer keine unselektiven Effekte zu erwarten sind (s. **Abb. 5.13** (A) und (B)).

Um auch in diesem Fall ausschließen zu können, dass die gewonnenen Resultate Zelltyp-abhängig sind, wurden dieselben Versuche mit BV173 Zellen durchgeführt. Hierbei konnte ein schnellerer Anstieg der inhibitorischen Aktivität verzeichnet werden, welche nach ca. 24 Std ihren maximalen Effekt erreicht hat (s. **Abb. 5.13** (C) und (D)). Diese Beobachtung ist vergleichbar mit den vorhergehenden Ergebnissen (s. **Abb. 5.13** (A) und (B)).

### 5.2.9 Evaluierung der Spezifität von Marbostat-100 (**13a**)



**Abb. 5.14.** Evaluierung der Spezifität von Marbostat-100 (**13a**). HEK293T Zellen wurden mit pcDNA3-HDAC6-FLAG oder pcDNA3.1 transfiziert und mit 500 nM Marbostat-100 (**13a**) für 48 Std inkubiert. HDAC6\* repräsentiert die stärkere Belichtung, um HDAC6 besser detektieren zu können. Die abgebildete Grafik wurde von Mandy Beyer erstellt.

Im nächsten Schritt sollte die Stärke des Inhibitors Marbostat-100 (**13a**) geklärt werden. Dafür wurde HDAC6 in HEK293T Zellen mit Hilfe des Plasmids HDAC6-FLAG überexprimiert. Mit diesem Plasmid für HDAC6 konnte untersucht werden, welche Effekte dieses Enzym auf die Zellen ausübt. Für diesen Versuch wurden HEK293T Zellen verwendet, da diese eine adhärente Zelllinie sind, die hervorragend für solche Modelle geeignet ist.<sup>57,184</sup> Bei pcDNA3.1 handelt es sich um einen Leervektor, er diente damit als Kontrolle.<sup>184</sup> Im Zuge von Voruntersuchungen konnte festgestellt werden, dass durch die Überexpression von HDAC6 der endogene HDAC6-Level überstrahlt wird.<sup>184</sup> Aus diesem Grund wurden für den in **Abb.**

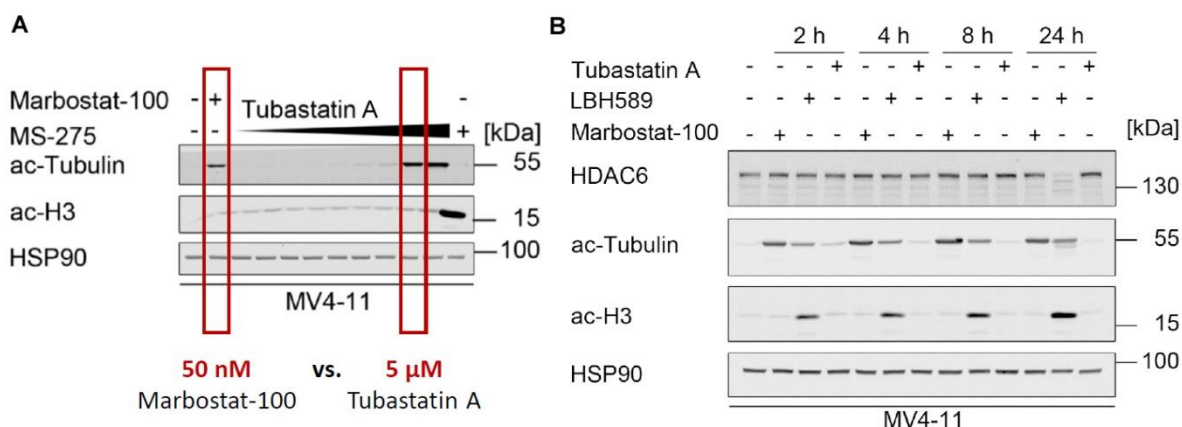
**5.14** dargestellten Blot zwei HDAC6-Banden mit unterschiedlichen Intensitäten verwendet. HDAC6\* repräsentiert die stärkere Belichtung und ermöglicht damit auch die Detektion des endogenen HDAC6-Enzyms.<sup>57</sup>

Wie im Rahmen der Konzentrations-Wirkungs-Studie mit dieser Zelllinie (s. **Abb. 5.11**) gezeigt werden konnte, führte eine Konzentration oberhalb von 500 nM **13a** zu keiner weiteren Zunahme der Hyperacetylierung des Tubulins. Aufgrund dieser Erkenntnis wurden die transfizierten HEK293T Zellen nicht mit 50 nM **13a**, wie bei dem vorhergehenden Versuch, sondern mit 500 nM inkubiert (s. **Abb. 5.14**). Die Konzentrationsänderung im Vergleich zu dem vorhergehenden Versuch erfolgte, um den Effekt, den Marbostat-100 (**13a**) bei Vorliegen einer Überexpression von HDAC6 hat, nicht am untersten Level zu betrachten.<sup>184</sup>

Wie erwartet,<sup>179</sup> reduzierte die Überexpression von HDAC6 den endogenen Acetylierungslevel des Tubulins (s. **Abb. 5.14**). Eine Inkubation der HEK293T Zellen, die entweder pcDNA3.1 oder HDAC6-FLAG exprimieren, mit Marbostat-100 (**13a**) führte zu einer deutlichen Intensitätszunahme der ac-Tubulin-Bande (s. **Abb. 5.14**).<sup>57</sup> Diese Daten demonstrieren, dass **13a** auch in der Lage ist, die HDAC6-Aktivität zu blockieren, wenn eine Überexpression dieses Enzyms vorliegt. Das lässt vermuten, dass HDAC6-abhängige Effekte *in vivo* von **13a** antagonisiert werden könnten.<sup>57</sup>

## 5.2.10 Untersuchungen zur Wirkstärke und Selektivität in Hinblick auf zytotoxische Effekte von Marbostat-100 (13a)

### 5.2.10.1 Vergleich von Marbostat-100 (13a) mit Tubastatin A (10) und LBH589 (3) - Wirkstärke und Selektivität



**Abb. 5.15.** Vergleich der Selektivität und Potenz von Marbostat-100 (**13a**) mit dem selektiven HDAC6i Tubastatin A (**10**) und dem potenten pan-HDACi LBH589 (**3**). (A) MV4-11 Zellen wurden mit 50 nM Marbostat-100 (**13a**), verschiedenen Konzentration des HDAC6i Tubastatin A (**10**, 5 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1 µM, 5 µM und 10 µM), oder mit 5 µM MS-275 (**6**) für 24 Std stimuliert. Die Effekte wurden über Western Blot-Analyse ermittelt. (B) MV4-11 Zellen wurden mit 50 nM **13a**, LBH589 (**3**)<sup>187</sup> oder **10**<sup>48</sup>, wie in der Grafik angegeben, inkubiert. Die abgebildeten Grafiken wurden von Mandy Beyer erstellt.

Die bisherigen Daten zur Leitverbindung **13a** veranschaulichen, dass es sich hierbei um einen sehr potenten und selektiven HDAC6i handelt. Daher sollte dessen biologische Wirksamkeit mit dem aktuell am häufigsten verwendeten HDAC6i verglichen werden - dem Tubastatin A (**10**)<sup>48,188</sup> (s. **Abb. 5.15** (A)). Dafür wurden verschiedene Konzentrationen von **10** in Relation zu der minimalen Dosis von **13a** gesetzt, bei der eine Induktion der Hyperacetylierung des Tubulins vorlag (50 nM) (s. **Abb. 5.15** (A)).

Bemerkenswerterweise konnte festgestellt werden, dass die ac-Tubulin-Bande, die durch Tubastatin A (**10**) induziert wurde, nur dann eine ähnlich starke Intensität wie jene von Marbostat-100 (**13a**) aufwies, wenn eine 100-fach höhere Konzentration von **10** (50 nM **13a** vs. 5 µM **10**) verwendet wurde (s. **Abb. 5.15** (A)).<sup>57</sup> Damit konnte belegt werden, dass **13a** in Bezug auf seine Wirkstärke dem **10** überlegen ist.<sup>57</sup>

Zur weiteren Evaluierung der Wirkstärke und Selektivität von Marbostat-100 (**13a**) wurde zusätzlich zu Tubastatin A (**10**) einer der potentesten und bereits von der FDA zugelassenen pan-Inhibitoren, das LBH589 (Panobinostat, **3**)<sup>47,187</sup> anstelle von MS-275 (**6**) als Negativkontrolle herangezogen. Zudem sollte innerhalb dieses Versuches der Einfluss der

Inkubationsdauer auf die Hemmaktivität ermittelt werden. Die Inkubationsdauer entsprach dabei der in **Abb. 5.15** (B) dargestellter Zeit.

Der Klasse I HDACi MS-275 (**6**) wurde dann als Referenz verwendet, wenn im Rahmen der Untersuchung geprüft werden sollte, ob die Testsubstanz eine Histon Hyperacetylierung (ac-H3) induziert. Bei dem in **Abb. 5.15** gezeigten Versuch lag jedoch der Schwerpunkt darauf zu eruieren, inwieweit **13a** mit einem etablierten Wirkstoff konkurrieren kann, der sowohl HDAC6 hemmt, als auch als pan-Inhibitor fungiert, weswegen LBH589 (**3**) als Vergleichssubstanz geeigneter ist.<sup>184</sup>

Im Rahmen der zellulären Testung (s. Kap. 5.2.8; **Abb. 5.10**) führte eine Konzentration von 50 nM **13a** zu einem deutlichen biologischen Effekt, weswegen für den in **Abb. 5.15** (B) gezeigten Versuch alle drei HDACi (Marbostat-100 (**13a**), Tubastatin A (**10**), LBH589 (**3**)) in derselben Konzentration eingesetzt und zur Ermittlung der Wirksamkeit und Spezifität (ac-H3) in Relation zueinander gesetzt wurden.<sup>184</sup>

**Abb. 5.15** (B) zeigt deutlich, dass nach einer Inkubationszeit von zwei Std eine ausgeprägte ac-Tubulin-Bande bei Marbostat-100 (**13a**) erkennbar ist, während der durch Tubastatin A (**10**) hervorgerufene Effekt vergleichbar mit der Kontroll-Bande ist und LBH589 (**3**) nur eine leicht stärkere Tubulin-Acetylierung als die Kontrolle induziert. Demnach kann das vorhergehende Ergebnis (s. **Abb. 5.15** (A)) dahingehend erweitert werden, dass **13a**, gemessen an der Tubulin-Acetylierung in MV4-11 Zellen, in äquimolaren Konzentrationen **10** nicht nur bezüglich der Wirkstärke, sondern auch in Bezug auf die Wirkdauer überlegen ist (s. **Abb. 5.15** (B)).<sup>57</sup>

Bei einem Vergleich zwischen LBH589 (**3**) und Marbostat-100 (**13a**) lässt sich feststellen, dass **13a** eine schnellere und effizientere Hyperacetylierung des Tubulins hervorruft (s. **Abb. 5.15** (B)). Des Weiteren ist bei der Inkubation mit dem pan-Inhibitor LBH589 (**3**) eine ac-H3-Anreicherung über den gesamten Zeitraum und eine Degradation des Target-Enzyms nach 24 Std (s. **Abb. 5.15** (B)) nachzuweisen. Entsprechende äquimolare Konzentrationen der Leitverbindung **13a** zeigten weder diesen proteolytischen Effekt, noch konnte über den gesamten betrachteten Zeitraum eine Bande für das nukleäre Substrat ac-H3 detektiert werden (s. **Abb. 5.15** (B)).<sup>57</sup>

### 5.2.10.2 Vergleich von Marbostat-100 (13a), Tubastatin A (10) und MS-275 (6) - Zellzyklusverteilung

Wie bereits in Kap. 5.1.2 erläutert, besteht zwischen dem DNA-Gehalt und der Zellzyklusphase, in der sich die Zelle befindet, ein Zusammenhang.<sup>189</sup> Demnach ermöglicht die Bestimmung des DNA-Gehaltes, Aussagen über den Zustand der Zelle treffen zu können. Zunächst sollte evaluiert werden, inwieweit Marbostat-100 (**13a**) im Vergleich zu dem etablierten selektiven HDACi Tubastatin A (**10**), dem Klasse I HDACi MS-275 (**6**) sowie dem potenten pan-HDACi (alle Zink-abhängige HDACs) LBH589 (**3**) einen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung nimmt. Die Konzentrationen der HDACi sind der **Abb. 5.16** zu entnehmen und entsprechen jenen, die sich im Rahmen der vorhergehenden zellulären Testungen als geeignet herausgestellt hatten.

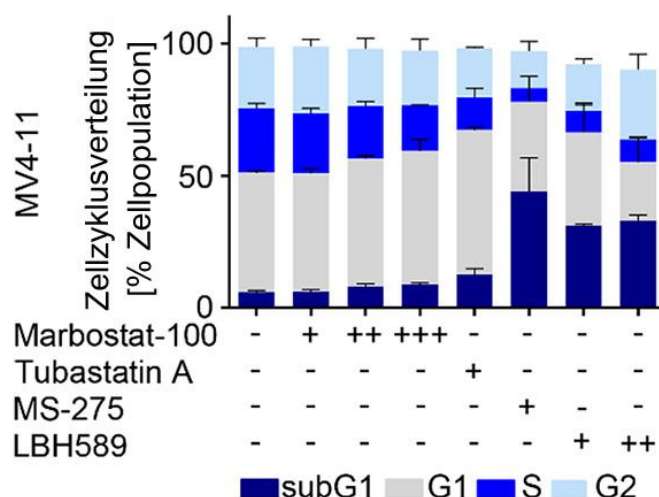
Für die Bestimmung des DNA-Gehaltes wurden die MV4-11 Zellen mit 80 % EtOH fixiert und mit dem Farbstoff Propidiumiodid (PI), einem Nukleinsäureinterkalator angefärbt.<sup>57,189</sup> Die Fixierung der Zellen diente dazu, die Membran für PI durchlässig zu machen, da dieser die intakte Membran von lebenden Zellen nicht durchdringen kann.<sup>171,184,189</sup> Das Fluoreszenzsignal, welches durch die Bindung des interkalierenden Farbstoffs an die DNA verschoben wird, ist proportional zur DNA-Menge und kann in der Durchflusszytometrie zur Analyse der Verteilung der Zellzyklusphasen in einer Zellpopulation verwendet werden (s. **Abb. 5.16**).<sup>171,189</sup>

Ausgehend von der Zellzyklusverteilung bei der Kontrolle (s. **Abb. 5.16**, links außen dargestellt), bewirkte **13a** im Gegensatz zu MS-275 (**6**) und LBH589 (**3**) auch bei einer Inkubation mit höheren Konzentrationen keine signifikanten Zellzyklusveränderungen. Bei einem Vergleich zwischen Tubastatin A (**10**) und der höchsten Konzentration von Marbostat-100 (**13a**: 1  $\mu$ M vs. **10**: 5  $\mu$ M) war nur ein geringfügiger Unterschied zwischen den Zellen mit intermediärem DNA-Gehalt (2-4 n; s. **Abb. 5.16**, S-Phase) und Zellen mit fragmentierter DNA erkennbar (sub-G<sub>1</sub>-Fraktion, s. **Abb. 5.16**).<sup>57</sup> Diese beiden Phasen (sub-G<sub>1</sub>- und S-Phase) wurden miteinander verglichen, da über den Anteil der S-Phasen auf den Anteil proliferierender Zellen geschlossen werden kann. Hätte Marbostat-100 (**13a**) eine antiproliferative Wirkung, so müsste bei Betrachtung einer gemischten Population die sub-G<sub>1</sub>-Phase zunehmen. Dies konnte mit diesem Versuch jedoch widerlegt werden.



Desweiteren kann festgehalten werden, dass die Leitverbindung **13a** vergleichbare Effekte auf die Zellzyklusverteilung ausübt wie der bereits im Tiermodell verwendete selektive HDAC6i Tubastatin A (**10**).<sup>57</sup>

MS-275 (**6**) und LBH589 (**3**) führten hingegen zu erheblichen Veränderungen des Zellzyklus. Der Anteil der Zellen mit einem geringen DNA-Gehalt ( $< 2n$ , sub-G<sub>1</sub>-Fraktion, s. **Abb. 5.16**) im Vergleich zur G<sub>1</sub>- und S-Phase nahm zu.<sup>57</sup> Dieses weist darauf hin, dass durch die Gabe dieser HDACi zytotoxische Effekte (fragmentierte DNA) verstärkt induziert wurden, da ein Fluoreszenzsignal, welches geringer als jenes der G<sub>1</sub>-Phase ist, auf apoptotische Zellen deutet (s. Kap. 5.1.2).<sup>189</sup>



**Abb. 5.16.** Evaluierung des Einflusses von Marbostat-100 (**13a**), Tubastatin A (**10**) und MS-275 (**6**) auf die Zellzyklusverteilung. MV4-11 wurden mit 50 nM, 500 nM, und 1  $\mu$ M Marbostat-100 (**13a**), 5  $\mu$ M Tubastatin A (**10**), 5  $\mu$ M MS-275 (**6**), 30 nM oder 50 nM LBH589 (**3**) entsprechend den Angaben in der Grafik für 24 Std inkubiert. Die Zellen wurden mit Propidiumiodid angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Kontrolle ist links außen dargestellt. Die ermittelten Prozentwerte werden unter der Angabe der Standardabweichung dargestellt. Die abgebildete Grafik wurde von Mandy Beyer erstellt.

### 5.2.10.3 Einfluss von Marbostat-100 (**13a**) auf Zellwachstum und Apoptose

Die aus **Abb. 5.16** gewonnenen Ergebnisse führten dazu, dass im nächsten Schritt evaluiert werden sollte, inwieweit der Effekt, den Marbostat-100 (**13a**) auf das Wachstum der Zellen ausübte, auch auf andere Leukämie-Zelllinien (Jurkat (s. **Abb. 5.17** (A)) und HEL (s. **Abb. 5.17** (B))) übertragbar ist. Dabei sollte anhand einer Konzentrationsreihe (s. **Abb. 5.17**) geprüft werden, ob es einen Konzentrationsbereich gibt, in dem Marbostat-100 (**13a**) zytotoxische Effekte aufweist. Als Vergleichssubstanz wurde MS-275 (**6**) gewählt.

MS-275 (**6**) führte auch in Jurkat- und HEL-Zellen zu einer Dysregulation des Zellzyklus und zu vermehrter Fragmentierung der DNA. Marbostat-100 (**13a**) hingegen wies in allen drei Zelllinien (s. **Abb. 5.16** und **Abb. 5.17** (A) und (B)) innerhalb des betrachteten Konzentrationsbereiches keine zytotoxischen Effekte auf und lässt sich damit als ein spezifischer Inhibitor bezeichnen, dessen inhibitorische Aktivität ausschließlich auf das HDAC6-Enzym bezogen ist.<sup>57</sup>

Um diese Beobachtung weiter zu verifizieren, wurde untersucht, ob Marbostat-100 (**13a**) und MS-275 (**6**) in gesunden mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) Auswirkungen auf die Zellviabilität ausüben (s. **Abb. 5.17** (C)).

Zur Differenzierung zwischen lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen werden Membranbestandteile lebender, nicht fixierter Zellen mit Annexin V markiert und mit PI angefärbt.<sup>184,190</sup> Dieser Methode liegt zugrunde, dass der biologische Membranbaustein Phosphatidylserin (PS) bei gesunden Zellen unter physiologischen Bedingungen auf der zytoplasmatischen Innenseite der Zellmembran zu finden ist.<sup>190</sup> Bei apoptotischen Prozessen kommt es jedoch zu einer Translokation des PS an die Außenseite der Membran.<sup>190</sup> Das Calcium-abhängige Protein Annexin V kann dann mit hoher Affinität an das PS binden.<sup>190</sup> Die Zugabe von PI ist notwendig, da bei alleiniger Markierung mit Annexin V eine Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen nicht möglich ist, da Annexin V aufgrund der permeabilisierten Membran von nekrotischen Zellen ebenfalls an das PS binden kann.<sup>190</sup> Der Farbstoff PI hingegen kann nur die DNA von nekrotischen Zellen anfärben. Annexin V ist seinerseits an einen Fluoreszenzfarbstoff, das Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt, wodurch eine durchflusszytometrische Bestimmung möglich ist.<sup>190</sup> Des Weiteren wurde für die Auswertung eine Negativkontrolle (s. **Abb. 5.17** “0”) verwendet. Dieses ist eine Zellprobe, die nicht mit den HDACi inkubiert und zu einer Hälfte mit Annexin V und zur anderen Hälfte mit PI versetzt wurde. Damit kann die entstehende Autofluoreszenz von der eigentlichen Fluoreszenz abgezogen werden.<sup>57</sup>

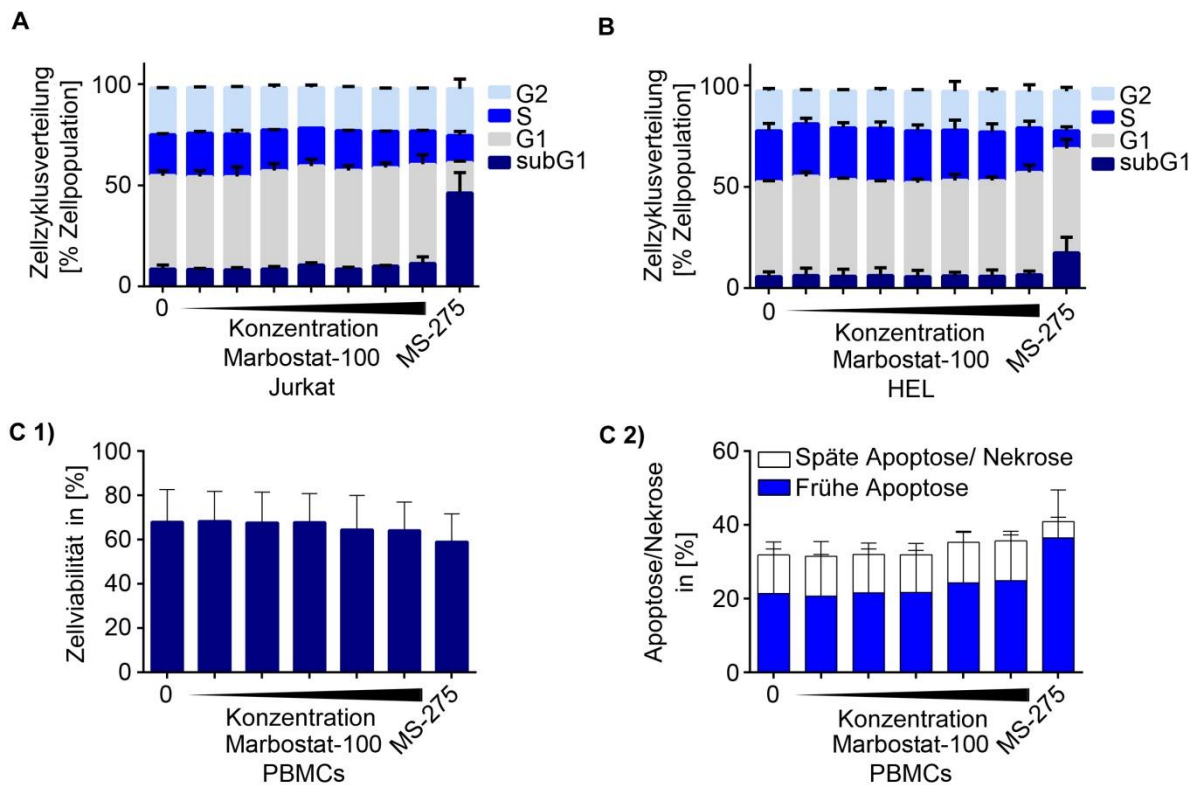
**Abb. 5.17** (C1) zeigt den Anteil (ca. 70 %) der lebenden Zellen an, die sich sowohl mit Annexin V, als auch mit PI nicht anfärben lassen.<sup>184</sup> Damit bestätigt **Abb. 5.17** (C) das vorhergehende Ergebnis, dass es sich bei Marbostat-100 (**13a**) um einen sehr spezifischen HDAC6i handelt, der innerhalb eines breiten Konzentrationsspektrums gezielt das Target-Enzym inhibiert, ohne gesunde Zellen anzugreifen.

Die fehlenden 30 % teilen sich in frühe Apoptose und späte Apoptose / Nekrose auf. Um zu eruieren, ob die Behandlung der Zellen mit Marbostat-100 (**13a**) oder MS-275 (**6**) zu

einer Verschiebung in die späte Apoptose führt, wurden bei **Abb. 5.17** (C2) die genannten Fraktionen untersucht.<sup>184</sup>

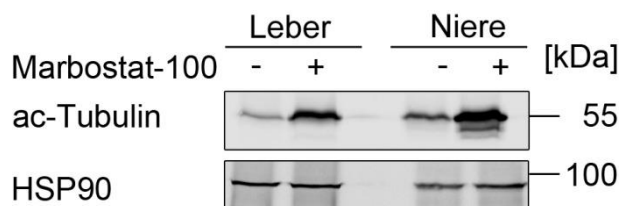
Mittels der FITC-Annexin V Markierung und Propidiumiodidfärbung konnte eine Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen vorgenommen werden. Zellen, die Annexin V positiv und PI negativ sind, sind apoptotisch, wohingegen Zellen, die sich sowohl mit Annexin V, als auch mit PI anfärben lassen, nekrotische Zellen oder Zellen in später Apoptose sind (**Abb. 5.17** (C1+2))<sup>184,190</sup>.

**Abb. 5.17** (C2) zeigt, dass MS-275 (**6**) im Vergleich zur Kontrolle bei rund 20 % (bezogen auf die Kontrolle) der gesunden Zellen zur Apoptose beiträgt, während Marbostat-100 (**13a**) bei keiner der betrachteten Konzentration Apoptose induziert.<sup>57</sup>



**Abb. 5.17.** Darstellung des Einflusses von Marbostat-100 (**13a**) auf Zellzyklusveränderungen und den Zelltod. (A) Jurkat und (B) HEL-Zelllinien wurden mit steigenden Konzentrationen an Marbostat-100 (**13a**; 5, 20, 50, 100, 250, 500 oder 1000 nM) oder 5  $\mu$ M MS-275 (**6**) für 24 Std stimuliert. Der Effekt auf die Zellzyklusverteilung wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen und wird unter Angabe der Standardabweichung dargestellt. (C 1+2) PBMCs wurden mit Marbostat-100 (**13a**; 50, 100, 250, 500 und 1000 nM) oder 5  $\mu$ M MS-275 (**6**) für 24 Std inkubiert und die Zellviabilität mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Für die Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose wurde eine Doppelfärbung mit Annexin V / Propidiumiodid (PI) durchgeführt. Die gezeigten Ergebnisse stellen repräsentative Daten aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen dar. Die ermittelten Prozentwerte wurden unter Angabe der Standardabweichung dargestellt. Die abgebildeten Grafiken wurden von Mandy Beyer erstellt.

#### 5.2.10.4 Evaluierung der Organgängigkeit von Marbostat-100 (13a)



**Abb. 5.18.** Einfluss von Marbostat-100 (**13a**) auf die HDAC6-Aktivität bei Betrachtung der Organe Leber und Niere. Männliche DBA / 1J Mäuse wurden mit 0,6 mg Marbostat-100 (**13a**) 15 Tage lang behandelt. Die Entnahme der Organe (Leber und Niere) erfolgte 2,5 Std nach der letzten Marbostat-100 (**13a**)-Applikation. Die Analyse wurde mittels Immunoblot durchgeführt, wobei ein Vergleich zwischen Marbostat-100 (**13a**) behandelten Tieren und Kontrolltieren hergestellt wurde. Lagerung der Organproben bis zur Messung erfolgte bei -80 °C. Die abgebildete Grafik wurde von Mandy Beyer erstellt.

Da die Leitverbindung **13a** in allen durchgeführten Testreihen eine durchgehend sehr potente und selektive Wirkung gegenüber HDAC6 aufwies, sollte abschließend *in vivo* die Organgängigkeit von Marbostat-100 (**13a**) untersucht werden. Dafür wurden männliche DBA / 1J Mäuse (s. Kap. 10.7.1) mit 0,6 mg Marbostat-100 (**13a**) 15 Tage lang behandelt und Leber und Nieren von behandelten und Kontroll-Tieren mittels Western Blot hinsichtlich des Acetylierungsgrades des Tubulins untersucht.<sup>57</sup> Die Selektivität der Leitverbindung **13a** wurde bereits durch vorhergehende Untersuchungen (s. Kap. 5.2.8-5.2.10.1) demonstriert, weswegen im Rahmen dieses Versuches keine Testung auf ac-H3 durchgeführt wurde.

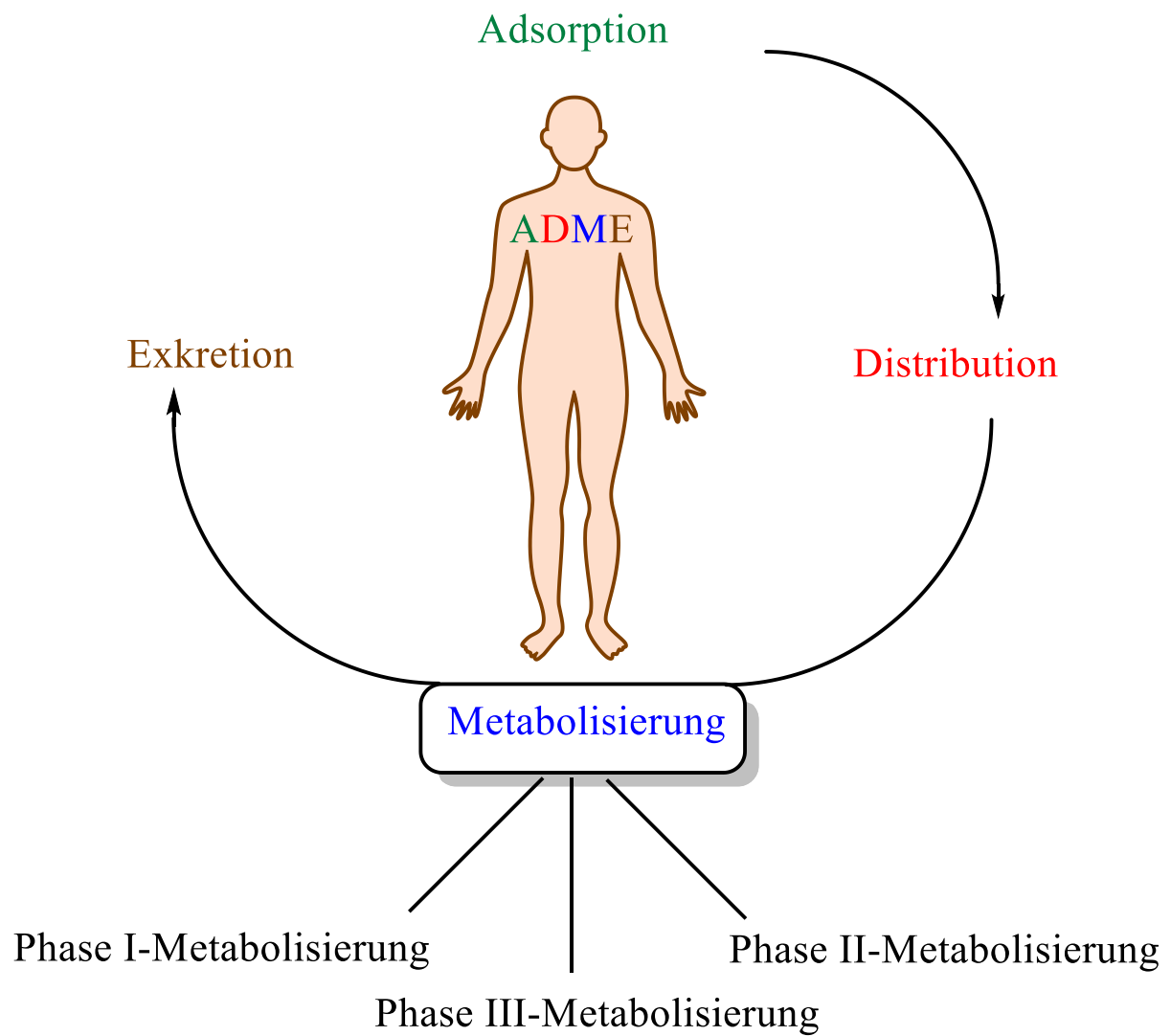
**Abb. 5.18** zeigt eine im Vergleich zur Kontrolle deutlich ausgeprägte Tubulin-Acetylierung bei Mäusen, die den HDAC6i erhielten. Die verstärkte ac-Tubulin-Anreicherung in der Niere lässt die Vermutung zu, dass der Abbau von Marbostat-100 (**13a**) möglicherweise über die Niere stattfindet. Dieses muss jedoch in weiteren Untersuchungen verifiziert werden.<sup>184</sup> Aus diesem Versuch konnte abgeleitet werden, dass **13a** auch in der Lage ist, die HDAC6-Aktivität *in vivo* zu beeinflussen.<sup>57</sup>

Wie in Kap. 7.6 detailliert beschrieben, übt HDAC6 multiple Funktionen aus und ist unter anderem an der Entstehung von Krankheitsbildern wie der rheumatoiden Arthritis beteiligt.

Der Einsatz von selektiven HDAC6i bei rheumatischen Erkrankungen konnte bereits durch Tubastatin A (**10**) gezeigt werden<sup>48,188</sup> und führte nach der ausführlichen Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehung von **13a** dazu, dass dieses in weiterer Folge im arthritischen Mausmodell getestet wurde (s. Kap. 7.8).

# Kapitel 6

## Pharmakologischer Teil (III von IV)



## 6 Metabolisierung

### 6.1 Einleitung

Die Entwicklung eines Arzneistoffes beginnt immer mit der Feststellung einer Erkrankung, welche man heilen möchte.<sup>191</sup> Durch Erforschungen der biochemischen Signalwege ist es möglich, sich auf ein bestimmtes Enzym bzw. Target zu konzentrieren, welches in der Pathogenese involviert ist.<sup>191</sup> Ist ein potenzieller Arzneistoff gefunden, der das gewählte Target in gewünschter Hinsicht beeinflusst, erfolgt die *in vitro*-ADME- (Adsorption, Distribution, Metabolisierung und Elimination)<sup>192</sup> Testung zur Abschätzung des pharmakokinetischen Profils des Arzneistoffes.<sup>191</sup>

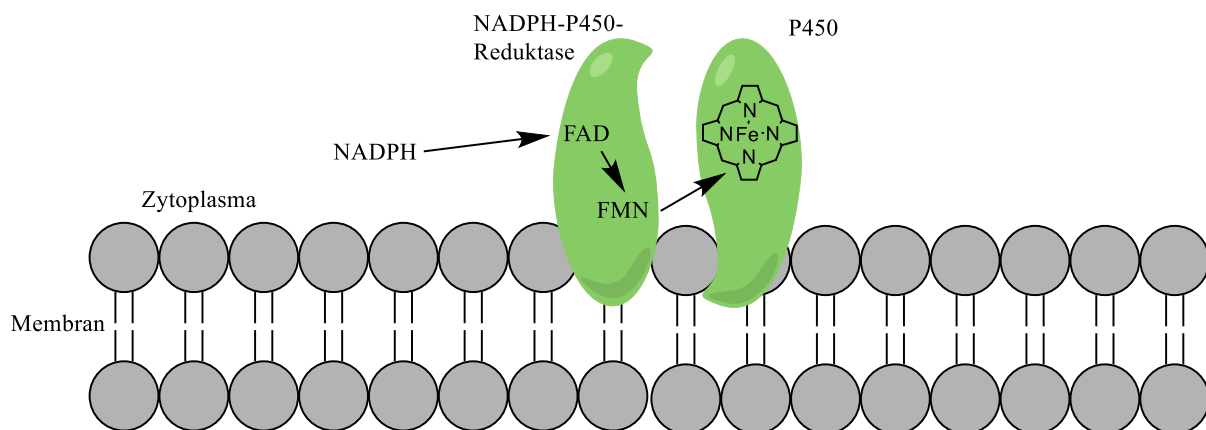
Da im Rahmen dieser Arbeit der Fokus auf der Metabolisierung lag, wird im Folgenden auf Adsorption, Distribution und Elimination nicht weiter eingegangen. Aufgrund der Komplexität des metabolischen Signalweges ist es *in vivo* schwierig, die Mechanismen, die sich auf biochemischer Ebene ereignen (z.B. involvierte Enzyme, gebildete Intermediate), zu ergründen.<sup>193</sup> Um frühzeitig Sicherheitsrisiken des potenziellen Arzneistoffes zu entdecken, sind *in vitro*-Studien in biologischen Matrices (von intakten Organen bis zu gereinigten Enzymen) von großer Bedeutung, wenn man sich vor Augen hält, dass eine Entwicklung eines solchen Arzneistoffes Milliarden kosten kann und einen Zeitaufwand von etwa 12 Jahren mit sich bringt.<sup>191,193</sup>

Die meisten pharmakologisch aktiven Moleküle sind lipophil und lassen sich nur partiell beim physiologischen pH-Wert in die ionisierte Form überführen.<sup>194</sup> Lipophile Arzneistoffe werden nach glomerulärer Filtration der Niere wieder rückresorbiert und verbleiben im Körper.<sup>194</sup> Da Metabolisierungsprozesse die Elimination von Arzneistoffen steuern, tragen diese Prozesse einen wesentlichen Beitrag zur Sicherheit und Effizienz des Arzneistoffes bei.<sup>195,196</sup>

#### 6.1.1 Das Cytochrom P450-System

Die Biotransformation findet außer in der Skelettmuskulatur und in den roten Blutzellen in allen Gewebetypen (Lunge, Niere, Darm, etc.) statt, wobei die Leber das Hauptorgan darstellt.<sup>197-200</sup> Sie ist eine Quelle Häm-enthaltender Enzyme, der sogenannten Cytochrom P450 (CYP450) Verbindungen, welche 1940 erstmals entdeckt wurden.<sup>201,202</sup> 1950 wurden sie als ein Pigment von Leberextrakten durch D. Garfinkel und M. Klingenberg charakterisiert.<sup>202</sup>

Die Namensgebung P450 (Pigment-450) rührt daher, dass in Anwesenheit von Kohlenstoffmonoxid das Absorptionsmaximum bei 450 nm (Soret-Bande) liegt.<sup>202</sup> Diese Beobachtung ist jedoch ungewöhnlich, da alle anderen Häm-enthaltenden Proteine, wie z.B. das Hämoglobin, das Licht bei 420 nm absorbieren.<sup>202</sup> Der Unterschied ist darin zu finden, dass der 5. Ligand in Nachbarschaft zum Häm-Molekül bei CYP450 ein Cysteinrest ist, während es sich beim Hämoglobin um ein Histidin handelt.<sup>202</sup> 1960 konnte eine lösliche, nicht membrangebundene P450-Form im Bakterium *Pseudomonas putida* von I. Gunsalus gefunden werden, die es ermöglichte, Untersuchungen am Enzym durchzuführen und 25 Jahre später zur Veröffentlichung ihrer Kristallstruktur führte.<sup>202</sup> Diese zeigt, dass das CYP450 aus  $\alpha$ -Helices (A-L) und  $\beta$ -Faltblättern ( $\beta$ 1- $\beta$ 4) aufgebaut ist, wobei die variable aktive Seite und die Hämgruppe in der  $\alpha$ -Helix lokalisiert sind.<sup>202</sup>



**Abb. 6.1.** Der Elektronentransfer zwischen NADPH-P450-Reduktase und CYP450. Darstellung in Anlehnung an Furge *et al.*<sup>202</sup>

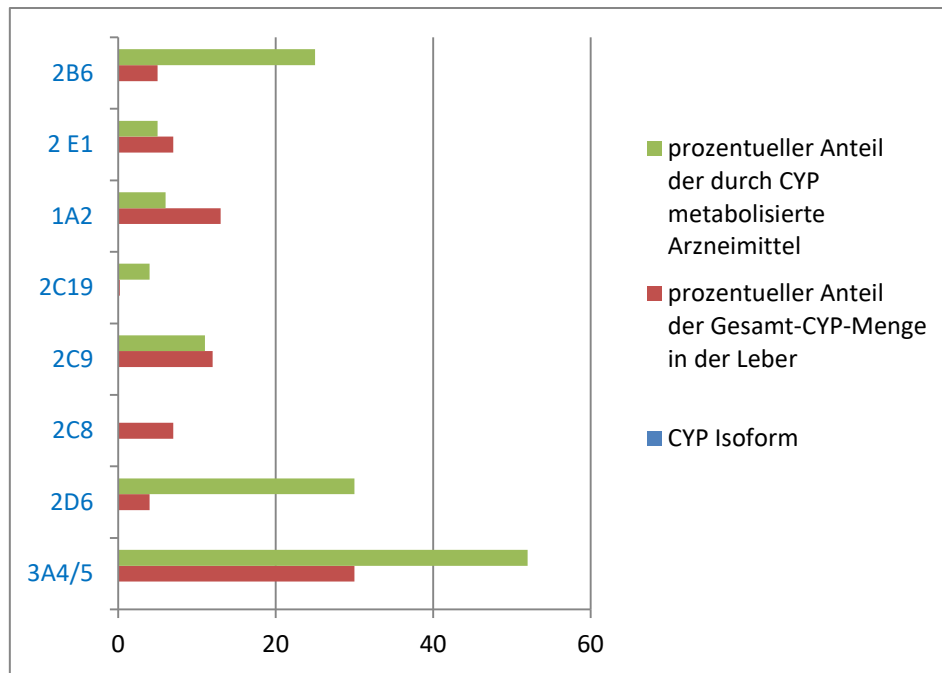
CYP450 ist ein membrangebundenes Protein, welches für seine Funktion als Monooxygenase Reduktions-Äquivalente benötigt, wie z.B. Elektronen von NADPH (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, reduzierte Form).<sup>200,202</sup> Übertragen werden die Elektronen durch Redoxpartner (z.B. NADPH-P450-Reduktase), welche ebenfalls in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) sitzen.<sup>202</sup> Man spricht von einem Zweikomponentensystem, wobei die NADPH-P450-Reduktase den zweiten Partner darstellt.<sup>194</sup> Das Flavoprotein NADPH-P450-Reduktase besteht aus zwei prosthetischen Redoxgruppen, FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) und FMN (Flavinmononukleotid).<sup>202</sup> Dabei werden die Elektronen für die Reduktion des molekularen Sauerstoffs von dem Cofaktor NADPH über FAD und FMN an die Hämgruppe des CYP450 zur Verfügung gestellt (s. **Abb. 6.1**).<sup>202</sup> Das Cytochrom P450 ist damit die Substrat- und Sauerstoff-bindende Seite des Enzyms.<sup>194</sup> Eine weitere Elektronübertragungsmöglichkeit an das CYP450 kann

ausgehend von NADH über das Cytochrom b5 - ebenfalls ein membrangebundenes Protein - erfolgen.<sup>202</sup>

Das CYP450-System besteht aus verschiedenen Isoenzymen, die sich in ihrer Gewebsverteilung unterscheiden und unterschiedliche chemische und immunologische Eigenschaften aufweisen.<sup>194</sup> Bei der Namensgebung der verschiedenen CYP450-Isoformen gibt die erste Zahl die Familie an, der Buchstabe die Unterfamilie und die letzte Zahl die individuelle P450-Form innerhalb der Familie (z.B. CYP 3A4).<sup>202</sup> 57 CYPs sind beim Menschen bekannt, von denen ein Dutzend hauptsächlich aus der Familie der CYP 1, 2, 3 kommt und für die Biotransformation von körpereigenen Substanzen sowie für 70-80 % aller Arzneistoffe, die im klinischen Gebrauch sind, verantwortlich sind.<sup>196,202-204</sup> CYP450-Enzyme sind, physiologisch gesehen nicht für die Verstoffwechselung von Xenobiotika zuständig, sondern für die Biosynthese und Metabolisierung von Steroiden, Gallensäuren, Fettsäuren, Prostaglandinen, Leukotrienen und anderen Verbindungen.<sup>197,205</sup>

Während von 13 der 57 CYPs die metabolische Funktion nicht bekannt ist und diese daher als „orphan“ bezeichnet werden,<sup>202</sup> ist von 1/3 der CYP450-Formen bekannt, dass diese in der Leber vorkommen.<sup>202</sup> Die Verteilung der dort am stärksten exprimierten Formen sowie ihr Anteil am Arzneistoffmetabolismus, wird in **Abb. 6.2** veranschaulicht.<sup>194,196,197,204,206</sup> CYP 2J2, CYP 1A1 und CYP 1B1 werden extrahepatisch exprimiert.<sup>204</sup>





**Abb. 6.2.** Relevante humane CYP-Isoformen und deren Anteil am Arzneistoffmetabolismus.<sup>206</sup>

Die Expression von CYP450 wird vielfältig beeinflusst. Genetische Polymorphismen, Xenobiotika, Zytokine, hormonelle Veränderungen, Alter, Geschlecht, Ernährung, Einnahme von Medikamenten, Umwelteinflüsse und Lebererkrankungen haben eine Bedeutung. Sie können damit zu inter- und intraindividuellen Unterschieden führen.<sup>194,204,205</sup>

### 6.1.2 Einfluss genetischer Polymorphismen

Genetische Polymorphismen spielen gerade bei den CYP-Isoformen 2D6, 2C19, 2C9, 2B6, 3A5 und 2A6 eine entscheidende Rolle und können zu unterschiedlichen pharmakogenetischen Phänotypen führen, die folgendermaßen unterteilt werden (hier am Beispiel von CYP 2D6 gezeigt):<sup>204</sup>

- 1) Langsame Metabolisierer:<sup>204</sup> besitzen zwei nicht funktionelle Allele, wodurch kein CYP 2D6 gebildet und somit der Metabolismus verlangsamt wird;
- 2) Intermediäre Metabolisierer:<sup>204</sup> besitzen entweder zwei Genkopien, die für ein Enzym mit reduzierter Aktivität codieren (homozygot) oder ein normales und ein dysfunktionales Allel (heterozygot);
- 3) Normale Metabolisierer:<sup>204</sup> es werden voll funktionsfähige CYP 2D6-Proteine in physiologischen Konzentrationen exprimiert;

- 4) Ultraschnelle Metabolisierer<sup>204</sup>: aufgrund von Genamplifikation sind zwei oder mehr Kopien funktionsfähiger Allele vorhanden.

Daher ist besonders bei Arzneistoffen, die über diese CYP-Isoformen metabolisiert werden, hinsichtlich der Effizienz, Dosisanpassung und Toxizität besondere Vorsicht geboten.<sup>204</sup>

### **6.1.3 Einfluss des Alters**

Bei Neugeborenen sind einige Enzymsysteme, wie zum Beispiel das CYP450, noch nicht vollständig ausgebildet, da sich diese erst im Laufe des ersten Lebensjahres vollständig entwickeln.<sup>204</sup> Eine weitere Besonderheit ist zum Beispiel die Expression von spezifischen Isoformen, wie CYP 3A7, welches nur im fetalen Alter vorhanden ist und eine Unterform der CYP 3A-Familie darstellt.<sup>204</sup> Mit zunehmendem Alter nimmt aufgrund der reduzierten Nierenfunktion, der niedrigeren Durchblutung der Leber, sowie der zunehmenden Arzneistoffeinnahme die Metabolisierungsrate ab.<sup>204</sup>

### **6.1.4 Einfluss von Krankheiten**

Das Vorliegen von Infektionen, Entzündungen, und die damit verbundene Zirkulation von proinflammatorischen Zytokinen können zu schwerwiegenden Downregulationen von Arzneistoff-metabolisierenden Enzymen beitragen.<sup>204</sup> Wenn die Erkrankungen die Leber betreffen (z.B. Leberzirrhose), ist bei der Einnahme von Medikamenten besondere Vorsicht geboten.

### **6.1.5 Epigenetische Einflüsse**

Histonmodifikationen beeinflussen die Zugänglichkeit und Transkriptionsaktivität des Chromatins. Epigenetische Mechanismen werden über microRNA (miRNA) reguliert, sind in der Regel reversibel, gewebspezifisch und werden durch Alter, Geschlecht, Umweltfaktoren, aber auch CYP Inhibitoren/Induktoren (Hormone, Arzneistoffe, etc.) beeinflusst.<sup>204</sup>

Einige Forschungsgruppen haben bereits erläutert, dass die miRNAs einen Einfluss auf die ADME-Genexpression haben.<sup>204</sup> Eine direkte Regulation konnte für folgende CYP-Isoformen gezeigt werden: CYP 1B1, CYP 3A4, CYP 2E1 und CYP 2B6.<sup>204</sup> Da CYP 3A4 und CYP 2B6 (s. **Abb. 6.2**) an vielen Biotransformationsprozessen beteiligt sind, kann sich ihr veränderter Expressionslevel auf die Metabolisierung ihrer Substrate auswirken.<sup>204</sup>

## 6.1.6 Die Phasen der Arzneistoff-Biotransformation

Die Biotransformation lässt sich in 3 Phasen unterteilen.

### 6.1.6.1 Phase I-Metabolisierung

In der Phase I erfolgt die Umwandlung nicht-polarer Arzneistoffe in polare durch die Einführung oder Freisetzung polarer Gruppen, wie Alkohole, Phenole und Amine durch N- und O-Dealkylierung, aliphatische und aromatische Hydroxylierung, N- und S-Oxidation und Deaminierung.<sup>197,198,201,205</sup> Unter den involvierten Enzymen der Phase I stellt die Familie der CYP450 den vorherrschenden Metabolisierungsweg für Xenobiotika und körpereigene Stoffe dar, wobei hier vor allem das CYP 3A4 zu erwähnen ist. Es gibt jedoch auch andere Enzyme, die ähnliche Reaktionen, wie die von CYP450, katalysieren können. Hier sind Flavinmonooxygenasen (FMO), Monoaminoxidasen (MAO), Peroxidasen und NAD<sup>+</sup>-abhängige Aldehyd- und Alkoholdehydrogenasen (ALDH / ADH) zu nennen.<sup>198,207</sup> Nach der Phase I-Metabolisierung sind jedoch nicht alle Xenobiotika ausreichend inaktiviert oder soweit transformiert, dass sie renal oder über Gallensekretion ausgeschieden werden können. Bei einigen ist die Einführung von sperrigen und polaren Gruppen durch Phase II-Enzyme erforderlich.<sup>206</sup> Für viele Arzneistoffe mag es zutreffen, dass eine Phase I-Biotransformation der Glucuronidierung vorausgehen muss, es gibt jedoch Substanzen, z.B. Zidovudin (Virostatikum bei HIV-1-Infektion eingesetzt), welches ohne den Einfluss von CYP450-Enzymen glucuronidiert wird, da es nucleophile Gruppen hat.<sup>208</sup>

Mit der Erforschung des Proteoms durch fortgeschrittene biochemische Methoden, konnten sogenannte „non-CYP450“-Enzyme, die ebenfalls an der Phase I-Biotransformation beteiligt sind, untersucht werden.<sup>196</sup> Viele der durch die „non-CYP450“ katalysierten Signalwege blieben lange Zeit unentdeckt, da z.B. durch die Einwirkung von FMO entstandene Metabolite auch durch CYP450-Aktivität auftreten können und sich damit eine Herausforderung hinsichtlich der Unterscheidung bot.<sup>196</sup>

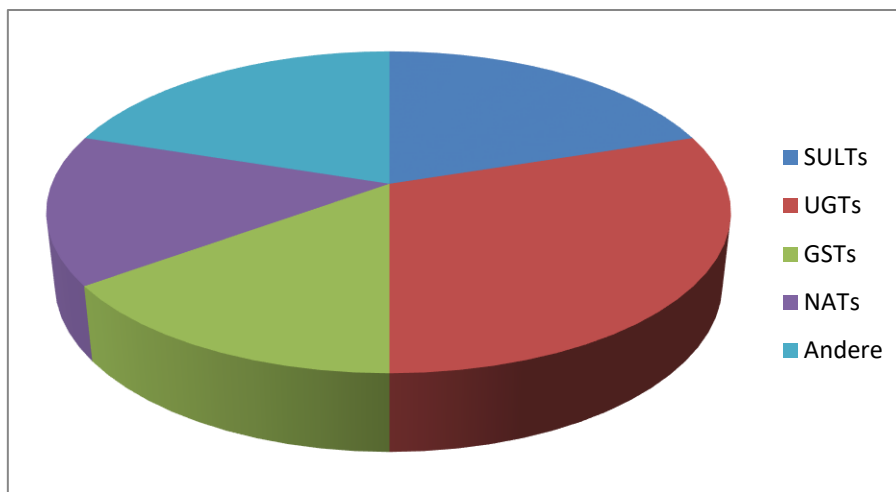
<u>Enzym</u>	<u>Cofaktor</u>	<u>Oxidative Reaktion</u>	<u>Substrat</u>
Flavinmonooxygenase (FMO1-5)	NADPH, Sauerstoff	N-Oxidation  S-Oxidation	Sekundäre Amine tertiäre aliphatische Amine Thiole, Thioharnstoffe
Monoaminoxidasen (MAO-A, MAO-B)	Sauerstoff	oxidative Desaminierung Dehydrierung	primäre Amine sekundäre Amine tertiäre Amine
Alkoholdehydrogenase (ALD)	NAD <sup>+</sup>	Alkoholoridierung	primäre Alkohole sekundäre Alkohole
Aldehyddehydrogenase (ALDH)	NAD (P) <sup>+</sup>	Aldehydoxidation	Aldehyde

**Tab. 6.1.** Signalwege, die im Rahmen der Arzneistoff-Metabolisierung von “non-CYP450”-Enzymen katalysiert werden. Darstellung in Anlehnung an Lit..<sup>207</sup>

Durch die Entdeckung von „non-CYP450“-Enzymen eröffnet sich die Möglichkeit, funktionelle Gruppen in das Molekül einzubauen, die ein Substrat für „non-CYP450“-Enzymen darstellen und somit eine Beeinflussung der Metabolisierung zugunsten des gewünschten Effektes ermöglichen.<sup>196</sup>

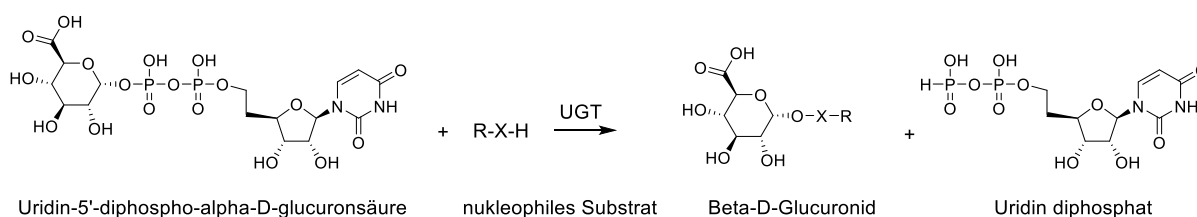
#### 6.1.6.2 Phase II-Metabolisierung

Zur Verbesserung der Löslichkeit und damit Steigerung der Elimination aus dem Körper, erfolgt in Phase II die Konjugation von Glucuronsäure, Sulfaten, Glutathion oder Methyl- und Acetylgruppen an organische Gruppen des Arzneistoffes.<sup>196,197</sup> Die an diesen Konjugationsschritten beteiligten Enzyme sind im Wesentlichen Uridindiphosphoglucuronosyltransferasen (UGT), N-Acetyltransferasen (NAT), Glutathion-S-Transferasen (GST) und Sulfotransferasen (SULT) (s. **Abb. 6.3**).<sup>195-197,201,203</sup>



**Abb. 6.3.** Anteil der einzelnen Phase II-Enzyme an der Biotransformation. Darstellung in Anlehnung an Lit..<sup>201</sup>

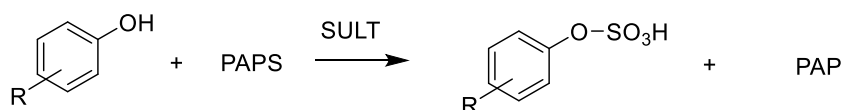
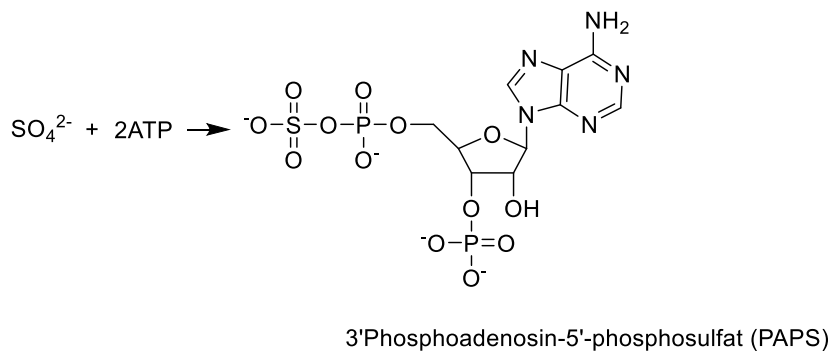
Im Folgenden sollen exemplarisch anhand einiger ausgewählter Phase II-Enzyme die Reaktionen gezeigt werden, die im Rahmen der Metabolisierungsprozesse ablaufen. UGTs sind membrangebundene Enzyme, welche eine chemische Bindung zwischen nukleophilen O, N, S- oder C-Atomen und einer Uridin-5'-diphospho- $\alpha$ -D-glucuronsäure (UDPGA) formen.<sup>196,201</sup> Während der Bindung an das Coenzym ist die Glucuronsäure am C1-Atom  $\alpha$ -konfiguriert.<sup>201</sup> Es kommt dann zu einer Inversion der Konfiguration, sodass das  $\beta$ -D-Glucuronid entsteht, welches leicht über Galle oder Urin ausgeschieden werden kann.<sup>201</sup> Bei Analgetika, NSAIDs und antiviralen Arzneistoffen wird vermutet, dass sie beim Menschen als Inhibitoren der Glucuronidierung agieren.<sup>201</sup> Beim Menschen sind 4 UGT-Familien bekannt, wobei die Isoformen UGT 2B7, UGT 1A1 und UGT 1A6 für 2/3 der Arzneistoff-Phase II-Metabolisierung zuständig sind.<sup>198</sup>



**Abb. 6.4.** Konjugation eines nukleophilen Substrates mit der Uridin-5'-diphospho-  $\alpha$ -D-glucuronsäure in Anlehnung an die Lit..<sup>201</sup>

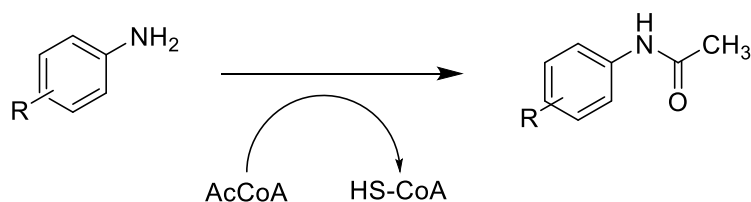
Sulfotransferasen (SULT), erstmals 1876 von Baumann beschrieben, katalysieren die Konjugation von 3'-Phosphoadenosin 5'-phospho-sulfat (PAPS) an O, N- oder S-Akzeptoren eines entsprechenden Xenobiotikums.<sup>201</sup> Das Pharmakophor für die SULTs sind aliphatische und aromatische Hydroxylgruppen.<sup>196</sup> SULTs scheinen die Hauptentgifter in der Entwicklungsphase des Fötus zu sein, da in der 20. Schwangerschaftswoche keine UGT-Aktivität nachgewiesen werden kann.<sup>201</sup> Andererseits werden viele Prokarzinogene

durch Sulfatierung in hoch reaktive Intermediate umgewandelt, die dann als Karzinogene agieren können, indem sie kovalent an die DNA binden.<sup>201</sup> Derzeit sind 4 SULT-Familien (SULT 1, SULT 2, SULT 4, SULT 6) bekannt.<sup>201</sup>



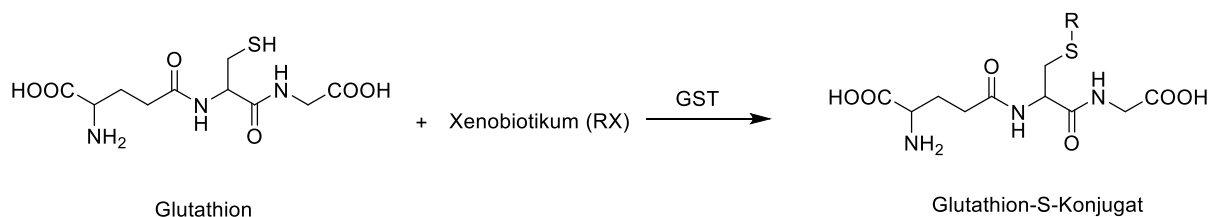
**Abb. 6.5.** Phase II-Reaktionsmechanismus katalysiert durch SULT. Darstellung in Anlehnung an Lit..<sup>201</sup>

An der Biotransformation von aromatischen Aminen und Hydrazinen sind Acetyl-CoA-abhängige NATs beim Transfer von Acetylgruppen des Acetyl-CoA auf die freie Aminogruppe beteiligt.<sup>201</sup> NATs aktivieren aromatische und heterozyklische Aminosäuren über O-Acetylierung, während eine N-Acetylierung der entsprechenden Amine zur Entgiftung führt.<sup>201</sup> NATs sind zytosolische Enzyme, von denen zwei Isoformen - NAT 1 und NAT 2 - bekannt sind.



**Abb. 6.6.** Acetylierung von Arylaminen durch NAT im Rahmen der Phase II-Biotransformation. Darstellung in Anlehnung an Lit.<sup>201</sup>

GSTs spielen beim zellulären Schutz gegen oxidativen Stress eine entscheidende Rolle.<sup>201</sup> Durch GSTs kommt es zu einer Thioetherbindung zwischen endogenem Glutathion und den entsprechenden Xenobiotika, die an nukleophilen aromatischen Substitutionen, Michael-Additionen etc. beteiligt sind.<sup>201</sup> Substrate der GSTs sind Verbindungen, die in der Lage sind, mit der Thiolgruppe des Glutathions zu interagieren. Dazu zählen elektrophile Verbindungen, wie z.B. Epoxide,  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Ketone und Ester.<sup>201</sup>



**Abb. 6.7.** Bildung von Glutathion-Konjugaten im Rahmen der Phase II-Biotransformation in Anlehnung an die Lit.<sup>201</sup>

### 6.1.6.3 Phase III-Metabolisierung

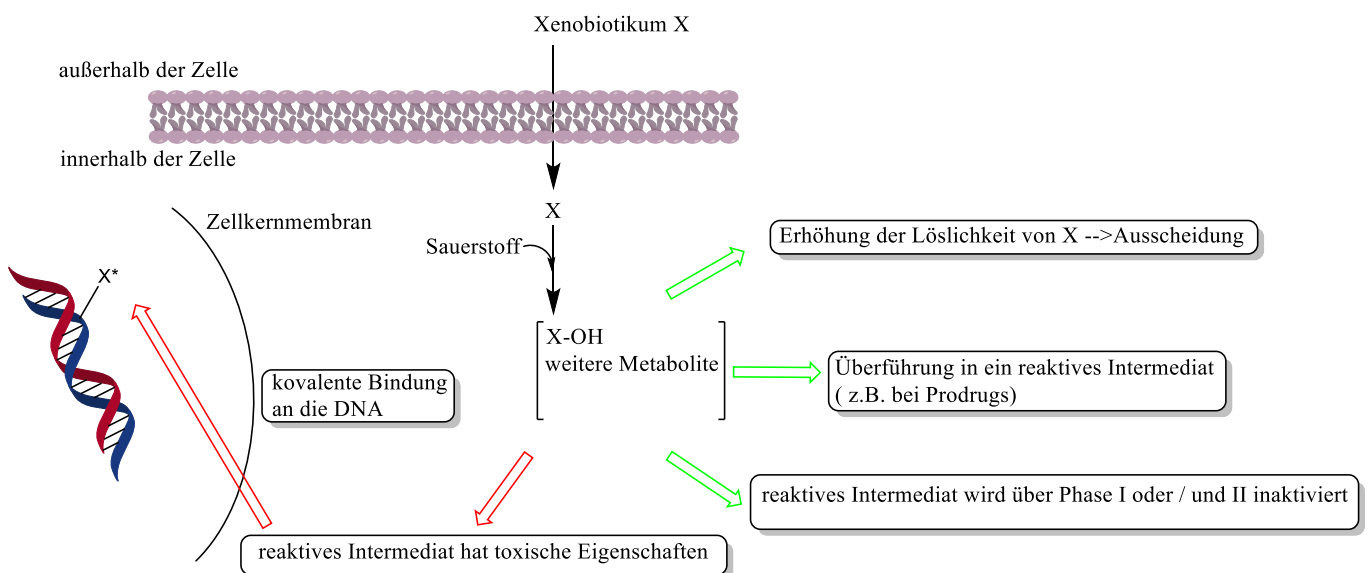
Für die Phase III-Biotransformation (Aufnahme- und Ausscheidungsprozess) sind Transporter (ABC- und SLC-Transporter) zuständig, die sowohl die therapeutische Effizienz, als auch die Absorption, Verteilung und Elimination beeinflussen.<sup>197,203</sup> Sie sind in den epithelialen als auch endothelialen Zellen der Leber, des gastrointestinalen Traktes, der Niere, sowie in anderen Organen lokalisiert.<sup>197</sup> Sie sind für den Transport durch zelluläre Barrieren notwendig und gewährleisten damit eine gewisse Arzneistoffkonzentration auf der Seite der Biotransformation stattfindet.<sup>196,197,203</sup> Damit nehmen sie Einfluss auf die Dauer und Intensität des Arzneistoff-Effektes.<sup>209</sup>

Bei den Arzneistoff-Wechselwirkungen oder -Interaktionen erfolgen 90 % im Bereich der Phase I, wodurch die Enzyme dieser Phase eine höhere Aufmerksamkeit in der Forschung erhalten, als jene, die in Phase II involviert sind.<sup>210</sup> 2/3 der auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe werden unter dem Einfluss von CYP450-Enzymen ausgeschieden, wohingegen

die Anzahl derjenigen, die mittels Glucuronidierung eliminiert werden, nur bei 1/7 liegt. Der Anteil an Arzneistoffen, welche über die Niere ausgeschieden werden, beträgt 1/3.<sup>198,208</sup>

### 6.1.7 Auswirkungen des metabolischen Prozesses

Der Prozess der Metabolisierung kann zu erwünschten als auch zu unerwünschten Effekten beitragen: Ein potentiell toxischer Arzneistoff kann entgiftet werden, indem er durch die Biotransformation inaktiviert wird (s. **Abb. 6.8**).<sup>195,197</sup> Es ist aber auch denkbar, dass ein verabreichter Arzneistoff durch die Biotransformation zu einem aktiveren Intermediat umgewandelt wird, wie dies z.B. im Falle mancher Prodrugs geschieht (s. **Abb. 6.8**). Das durch den Metabolisierungsprozess entstandene Intermediat kann jedoch auch pharmakologisch unerwünschte bzw. toxische Wirkungen aufweisen.<sup>191,206</sup> Ein Beispiel, in der die Oxidation durch CYP450-Enzyme zu einem toxischen Metaboliten führt, ist bei Inhaltsstoffen des Zigarettenrauches zu finden, welche in ihre karzinogenen Formen umgewandelt werden.<sup>202</sup> Auch wenn reaktive Intermediate nur eine kurze Lebenszeit aufweisen, können sie durch eine kovalente Bindung an nukleophile Moleküle, wie man sie z.B. in Proteinen, Lipiden und der DNA findet, zu schweren Schäden führen (s. **Abb. 6.8**).<sup>202</sup>



**Abb. 6.8.** Phase I- und II-bedingte Metabolisierungsprodukte im Rahmen eines Biotransformationsprozesses. Darstellung in Anlehnung an Lit..<sup>202</sup>

Um den Prozess der Metabolisierung für potenzielle neue Arzneistoffe exakt analysieren zu können, ist die Kenntnis über Substrate, Inhibitoren und Induktoren (der am häufigsten in die Biotransformation involvierten CYP-Isoformen) essentiell. Barbiturate fungieren beispielsweise als Induktoren, welche zum einen den Vorteil haben können, dass die letale



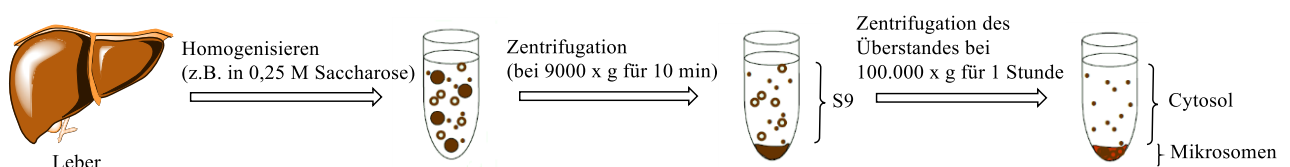
Wirkung eines gleichzeitig applizierten Arzneistoffes ausbleibt (therapeutische Kombination aus Barbiturat und Warfarin). Zum anderen kann die gesteigerte Metabolisierung dazu beitragen, dass toxische Intermediate (z.B. von Acetaminophen) vermehrt gebildet werden.<sup>205</sup> Ein weiteres Beispiel ist die gleichzeitige Gabe von Rifampicin und oralen Kontrazeptiva: Hier kommt es bedingt durch Rifampicin zu einer Induktion von CYP 3A4, welche zu einer Abnahme der kontrazeptiven Wirkung um 32 % führt.<sup>211</sup> Die Induktion der Metabolisierung kann einerseits, wie hier am Beispiel von Rifampicin und Barbiturat gezeigt, durch einen Arzneistoff erfolgen, andererseits durch genetische und umweltbedingte Einflüsse (z.B. Zigarettenrauch als Induktor von CYP 1A1).<sup>205</sup>

Da ein CYP450-Enzym mehrere Substrate haben kann, kann es zur Konkurrenz um die Bindung kommen, welches zur Inhibition führt.<sup>194</sup> Als bekannte Inhibitoren sind folgende Substanzen zu erwähnen: Grapefruit-Saft (Inhibitor von CYP 3A4), Makrolidantibiotika (z.B. Erythromicin, Inhibitor von CYP 3A4) und Ketoconazol (Inhibitor von CYP 3A4, CYP 2C18, CYP 2C19).<sup>193,198</sup>

### 6.1.8 *In vitro*-Modelle

Da es seitens der FDA (*Food and Drug Administration*) die Forderung gibt, jeden neuen potenziellen Arzneistoff in der frühen Phase der Entwicklung hinsichtlich seiner Metabolisierung zu testen, werden im Folgenden die bis dato zur Verfügung stehenden *in vitro*-Modelle beschrieben.<sup>196,202</sup>

#### Präparation von S9, Mikrosomen und Cytosol



**Abb. 6.9.** Präparation der subzellulären Fraktionen in Anlehnung an Jan G. Hengstler.

Zunächst wird die Leber homogenisiert, dann erfolgt bei relativ niedriger Geschwindigkeit der erste Zentrifugationsschritt (z.B. 9000 x g), um ganze Zellen, freie Kerne, Plasmamembran und Mitochondrien zu entfernen. Im Überstand befindet sich nun die S9-Fraktion.<sup>195</sup>

Durch weitere Zentrifugation bei schnellerer Geschwindigkeit kommt es zur Formation eines

Pellets des ER, welches die CYP450-Isoenzyme und UGTs enthält.<sup>195</sup> Diese Form der Leberpräparation zur Erhaltung von subzellulären Fraktionen wurde erstmals von Omura & Sato beschrieben.<sup>206</sup>

### Supersome

Supersome sind Mikrosome, die Vesikel aus hepatozytischem ER von a) menschlichen CYP-Isoformen oder b) UGT transfizierten Insektenzellen enthalten.<sup>197</sup> Sie werden auch als Baculosome bezeichnet, da die Insektenzellen zuvor mit rekombinanten Bakterien infiziert wurden.<sup>197</sup> Für ihre Aktivität benötigen sie als Cofaktor ein NADPH-Regenerationssystem (s. Kap. 10.6.1).<sup>197</sup> Da die Möglichkeit besteht spezifische CYPs und / oder UGTs zu exprimieren, können Supersome auch zur Untersuchung einzelner Enzyme, die für den jeweiligen Arzneistoff von Bedeutung sind, verwendet werden.<sup>203</sup>

Vorteile	Nachteile
Zu Untersuchungen von Arzneistoffwechselwirkungen und dem Einfluss verschiedener Polymorphismen geeignet <sup>197,203</sup>	in UGT- Supersomen ist die UGT aktive Seite durch eine hydrophobe Barriere abgeschirmt, wodurch eine Glucuronidierung zum Erliegen kommt. Dem kann man durch Zugabe von Alamethicin, einem porenformenden Agens, entgegensteuern <sup>197,203</sup>
kostengünstig <sup>198</sup>	
Funktion einzelner Enzyme evaluierbar <sup>198</sup>	
kommerziell erhältlich <sup>197,203</sup>	

**Tab. 6.2.** Vor- und Nachteile der Supersome als *in vitro*-Modell.

### Cytosol

Dieses Modell wird durch verschiedene Zentrifugationsschritte (s. **Abb. 6.9**) aus dem ganzen Leberhomogenisat gewonnen, ähnlich zum Präparationsverfahren der Mikrosomen.<sup>197,203</sup> Es enthält die löslichen Phase II-Enzyme GST, NAT, SULT.<sup>203</sup> Die Zugabe von Cofaktoren, wie Acetyl-CoA-Regenerationssystem für NAT, 3'-Phosphoadenosin 5'-phospho-sulfat für SULT und das Glutathion für GST ist erforderlich.<sup>197,203</sup>

Vorteile	Nachteile
Da nur drei Hauptenzyme (NAT, SULT und GST) enthalten sind, im Gegensatz zu S9, können diese separat oder in Kombination analysiert werden <sup>197,203</sup>	UGT, welches sich auf der ER-Seite befindet, wird nicht erfasst <sup>197</sup>
kostengünstig <sup>198</sup>	nur lösliche Phase II-Enzyme werden analysiert <sup>197,203</sup>
kommerziell erhältlich <sup>197,203</sup>	

**Tab. 6.3.** Vor- und Nachteile des Cytosols als *in vitro*-Modell.

### S9-Fraktion

Diese Fraktion wird aus dem Lebergewebe durch Zentrifugation gewonnen (s. **Abb. 6.9**). Seit 1970 wird dieses Modell verwendet, allerdings weniger häufig als die Mikrosomen.<sup>197,203</sup> Es beinhaltet mikrosomale und zytosolische Fraktionen, womit ein komplettes metabolisches Profil repräsentiert werden kann. Im Gegensatz zu den Hepatozyten fehlt allerdings bei diesem Modell der Einfluss von Membranbarrieren und Transportern.<sup>197,203,206,211</sup> Der Zusatz von Cofaktoren (NADPH-Regenerationssystem und UDPGA + Alamethicin für die UGT-Aktivität) ist erforderlich.<sup>197,203</sup>

Vorteile	Nachteile
einfache Durchführung <sup>203</sup>	Aufhebung von Kompartimentierungseffekten <sup>211</sup>
kostengünstig <sup>203</sup>	CYP-Aktivität macht nur 20 - 25 % aus, verglichen mit der CYP-Aktivität von Mikrosomen <sup>206</sup>
kommerziell erhältlich <sup>197</sup>	
kann tiefgefroren aufbewahrt werden <sup>197</sup>	
in einigen Fällen können Metabolite im Cytosol oder in den Mikrosomen nicht gefunden werden, jedoch in der S9-Fraktion <sup>203</sup>	

**Tab. 6.4.** Vor- und Nachteile der S9-Fraktion als *in vitro*-Modell.

## Zelllinien

Die am häufigsten verwendete Zelllinie ist HepG2, welche aus einem Leberzellkarzinom gewonnen wurde.<sup>197,203,211</sup> Zelllinien werden für Toxizitäts-Studien herangezogen oder für Untersuchungen von Effekten, bei welchen der Metabolismus einem bestimmten Enzym zugeordnet werden kann.<sup>197,203</sup> Dieses Modell wird nicht so häufig verwendet, da die artifizielle Expression und damit der Verlust von Zelltyp-spezifischen Eigenschaften die Untersuchung des physiologischen Zusammenspiels mehrerer Enzyme nicht erlaubt.<sup>197,203</sup>

Vorteile	Nachteile
leicht zu kultivieren im Vergleich zu Hepatozyten <sup>203</sup>	Schlechteres Metabolisierungsprofil im Vergleich zu Mikrosomen und Leberschnitten <sup>203</sup>
stabile Enzymkonzentration <sup>203</sup>	niedrige oder vollständige Abwesenheit einiger Phase I und Phase II-Enzymen führt zum seltenen Gebrauch <sup>203</sup>
gute Reproduzierbarkeit <sup>203</sup>	

**Tab. 6.5.** Vor- und Nachteile der Zelllinien als *in vitro*- Modell.

## Transgene Zelllinien

1993 haben Crespie *et al.* als erste eine stabile Expression humaner CYPs in humanen Zelllinien erreicht.<sup>197,203</sup> Dieses Modell wird zur Strukturaufklärung und zu Untersuchungen von Arzneistoff-Wechselwirkungen herangezogen.<sup>197,203</sup>

Vorteile	Nachteile
hohe Expression von CYP und UGT Isozymen <sup>197,203</sup>	teuer im Vergleich zu anderen Modellen <sup>197,203</sup>
kommerziell erhältlich <sup>197,203</sup>	repräsentiert nicht die komplette <i>in vivo</i> -Situation aufgrund von Vorhandensein nur einiger Enzyme <sup>197,203</sup>
leicht zu kultivieren <sup>197,203</sup>	
einzelne Enzymreaktionen studierbar, wie bei Supersomen <sup>197,203</sup>	

**Tab. 6.6.** Vor- und Nachteile der transgenen Zelllinien als *in vitro*-Modell.

## Hepatozyten

Hepatozyten werden aus der ganzen Leber gewonnen, wenn es sich um eine tierische Probe handelt, bei Menschen werden Biopsieproben verwendet.<sup>211</sup> Dieses Modell spiegelt Phase I- und Phase II-Biotransformationen wieder, benötigt keine externe Zugabe von Cofaktoren und ähnelt damit sehr der *in vivo*-Situation.<sup>198,203</sup> Hiermit sind sowohl qualitative als auch quantitative Analysen durchführbar.<sup>206</sup>

Vorteile	Nachteile
sehr gute Korrelation mit der <i>in vivo</i> -Situation <sup>203</sup>	Da die ganze Leber benötigt wird, kommen nur tierische Proben in Frage, außer es kommt zu einer Resektion beim Menschen <sup>203</sup>
kommerziell erhältlich <sup>203</sup>	interindividuelle Variationen <sup>197</sup>
Identifikation der Metabolite <sup>197</sup>	kurze Haltbarkeit: in Kultur max. 4 Wochen, in Suspension 4 Std <sup>203</sup>
Bestimmung der metabolischen Stabilität <sup>197</sup>	die Aktivität einzelner Enzyme kann nicht analysiert werden <sup>203</sup>
	Aktivitätsabnahme einiger CYP-Isoformen erfolgt schneller als bei anderen <sup>203</sup>
	hohe Variabilität <sup>198</sup>

**Tab. 6.7.** Vor- und Nachteile der Hepatozyten als *in vitro*-Modell.

## Leberschnitte

Dieses Modell wurde 1920 von Otto Heinrich Warburg entwickelt. Es wird immer häufiger verwendet, da es nun mehr Techniken gibt, die das Schneiden dünner Leberschnitte (250 µm) ermöglichen und damit eine gute Reproduzierbarkeit gewährleisten.<sup>203</sup> Leberschnitte enthalten Phase I- und II-Enzyme, benötigen keine externe Zugabe von Cofaktoren und weisen ähnliche Einsatzgebiete, wie die für die Hepatozyten beschriebenen, auf.<sup>198</sup> Die Inkubation findet in einem nährstoffreichen Medium statt, weswegen Diffusionsprozesse (Nährstoffe und Sauerstoff) in diesem Modell zu einer verkürzten CYP-Aktivität beitragen.<sup>203</sup>

Vorteile	Nachteile
intakte Gewebsstruktur <sup>203</sup>	nicht kommerziell erhältlich <sup>203</sup>
für qualitative und quantitative Analysen geeignet <sup>203</sup>	teuer <sup>198</sup>
gute Korrelation zur <i>in vivo</i> -Situation <sup>198</sup>	Kryokonservierung problematisch <sup>203</sup>
	bei 4 °C Lagerung bleiben die Schnitte 48 Std funktionsfähig <sup>203</sup>

**Tab. 6.8.** Vor- und Nachteile der Leberschnitte als *in vitro*-Modell.

#### Isolierte perfundierte Leber

Hierbei handelt es sich um ein Modell, das nur dann verwendet wird, wenn die Gallensekretion von Bedeutung ist.<sup>197,203</sup>

Vorteile	Nachteile
Bei Fokus auf die Gallensekretion gut geeignet <sup>203</sup>	geringe Reproduzierbarkeit <sup>203</sup>
	teuer <sup>198</sup>
	keine humanen Proben <sup>203</sup>
	schwer in der Handhabung <sup>198,203</sup>
	nur für 3 Std funktionsfähig <sup>203</sup>

**Tab. 6.9.** Vor- und Nachteile der isolierten perfundierten Leber als *in vitro*-Modell.

#### Humane Lebermikrosomen (HLM)

Mikrosomen enthalten neben den membrangebundenen CYP-Enzymen, Carboxylesterasen und Amidasen noch weitere Enzymsysteme (ebenfalls membrangebunden), welche N- und S-Oxidation, sowie Oxidation von Xenobiotika (die Phosphor und Selen enthalten) durchführen können.<sup>207,211</sup> Zu diesen Enzymen gehören FMOs, welche NADPH als Cofaktor benötigen.<sup>207</sup> –CH oder –C=O Bindungen sind hiervon nicht betroffen, da das Enzym nicht ausreichend starke Oxidationskraft aufweist.<sup>207</sup> Diese subzelluläre Fraktion aus ER hepatischer Zellen wird durch Homogenisation der Leber gewonnen (s. **Abb. 6.9**) und gehört zu den am meisten verwendeten Modellen.<sup>197</sup> Hauptsächlich wird mit Hilfe dieses Modells, nach Zugabe der entsprechenden Cofaktoren, die Phase I-Metabolisierung untersucht.

Da jedoch das UGT, als einziges Phase II-Enzym, ebenfalls in den Mikrosomen enthalten ist, kann nach Zugabe von UDPGA die Glucuronidierung analysiert werden.<sup>197,203</sup> Es gibt eine Vielzahl an verschiedenen humanen Mikrosomen, die es sogar ermöglichen, geschlechtsspezifische Einflüsse zu untersuchen.<sup>197,203</sup>

Vorteile	Nachteile
interindividuelle Unterschiede durch Verwendung verschiedener Donoren umgebar <sup>197,203</sup>	je nach Hersteller und deren Präparationsprozessen können die Aktivitäten stark variieren <sup>206</sup>
gute <i>in vivo</i> -Korrelation <sup>197</sup>	nicht für quant. Bestimmung geeignet, da hohe Level an CYPs und UGTs, aber keine Konkurrenz mit anderen Enzymen stattfindet <sup>197,203</sup>
für die Identifikation der Metabolite geeignet <sup>197</sup>	höhere Biotransformation als es <i>in vivo</i> der Fall ist <sup>203</sup>
kostengünstig <sup>197,203</sup>	höhere Metabolisierungsraten als in den Hepatozyten und Leberschnitten <sup>203</sup>
einfache Anwendung <sup>203</sup>	Abwesenheit von NAT, SULT, GST und Cofaktoren <sup>197</sup>
kommerziell erhältlich <sup>203</sup>	pH-Werte, sowie organ. Lösungsmittel können die Ergebnisse beeinflussen <sup>197</sup>
Enzymaktivität kann für mehrere Jahre aufrechterhalten werden <sup>206</sup>	
das am Besten charakterisierte Modell <sup>197,203</sup>	

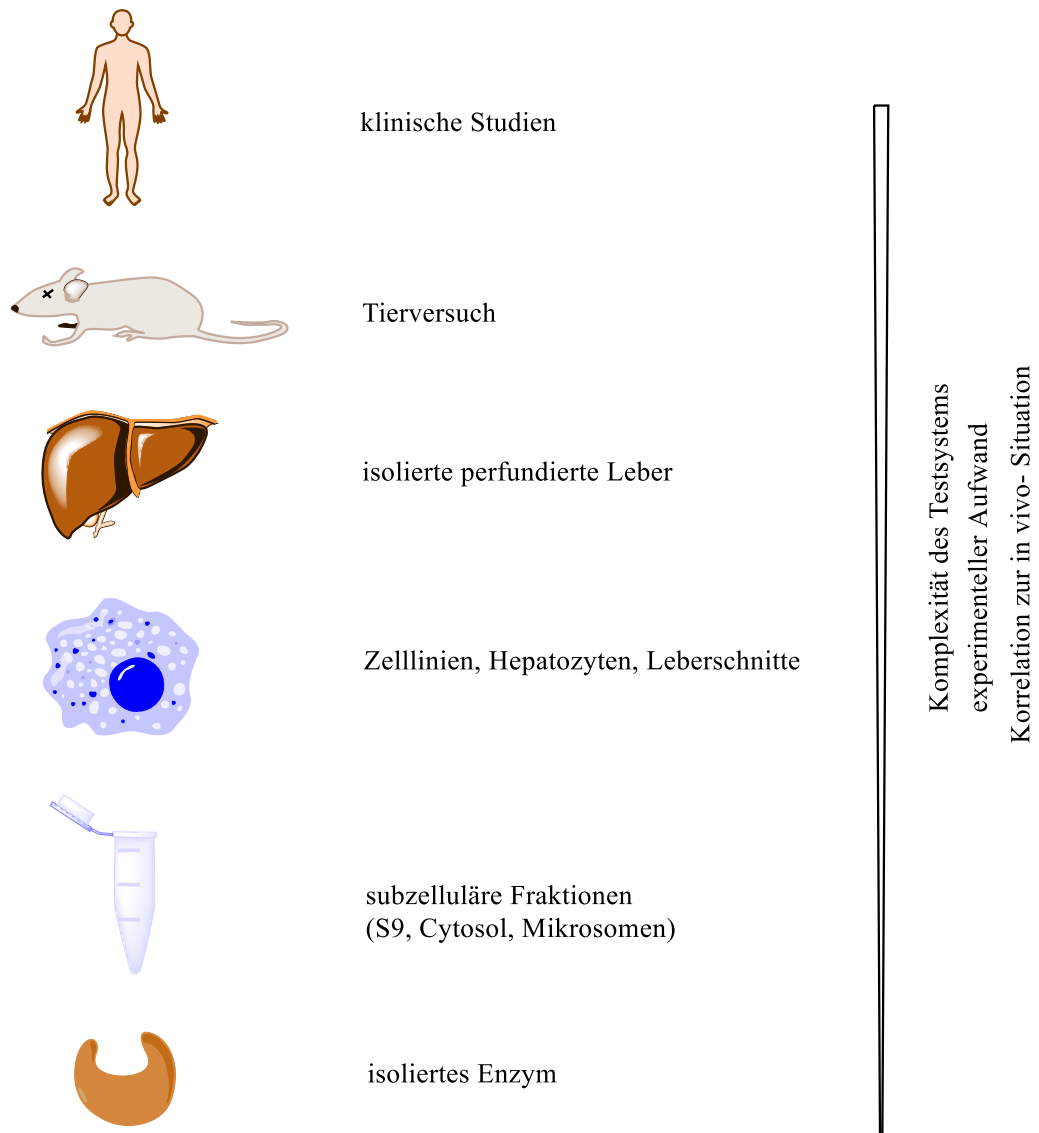
**Tab. 6.10.** Vor- und Nachteile der humanen Lebermikrosome als *in vitro*-Modell.

### 6.1.9 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Nachteil aller subzellulärer Fraktionen (S9, Cytosol und Mikrosomen) der ist, dass die in diesen Modellen nachgeahmte Biotransformation nicht durch Transporter beeinflusst wird, welche jedoch in einem intakten Organismus als Phase III–Komponenten eine erhebliche Rolle spielen.<sup>203</sup>

Jedes der hier vorgestellten *in vitro*-Systeme hat seinen spezifischen Nutzen, aber auch Grenzen hinsichtlich der Verfügbarkeit, der Kosten, der Handhabung sowie der Leistungsfähigkeit der im Modell vorhandenen Enzyme.<sup>198</sup> Um eine effiziente Anwendung der *in vitro*-Modelle zu gewährleisten und damit die möglichst beste Korrelation zur *in vivo*-Situation zu erhalten, empfiehlt es sich, bei *in vitro*-Testungen eine bestimmte Reihenfolge einzuhalten. In der Regel startet man mit den Mikrosomen sowie der Cytosol-Fraktion, da diese leicht in ihrer Anwendung sind, eine kostengünstige Variante darstellen und eine gute Möglichkeit zur Identifikation der Metabolite bieten.<sup>203</sup> Die Supersome werden im nächsten Schritt verwendet, da diese die Option bieten, spezifische CYPs oder UGTs zu exprimieren und damit die Untersuchung auf einzelne Enzyme zu fokussieren.<sup>203</sup> Als nächstes wird die S9-Fraktion zur Verifizierung der bereits identifizierten Metabolite aus Cytosol und Mikrosomen eingesetzt oder zur Entdeckung jener Metabolite, die in den beiden vorher genannten *in vitro*-Modellen nicht analysierbar waren.<sup>203</sup> Im Anschluss folgen aufgrund ihrer begrenzten Haltbarkeit, der teuren Anschaffung, sowie der aufwendigeren Handhabung, die komplexeren *in vitro*-Modelle (s. **Abb. 6.10**).<sup>203</sup>





**Abb. 6.10.** Testsysteme zur Untersuchung des Arzneistoffmetabolismus in Anlehnung an die Lit..<sup>198</sup>

Forschungsschwerpunkt	<i>In vitro</i> -Modell
Arzneistoff-Biotransformation	Mikrosomen und Cytosol Supersome und NAT Cytosol S9-Fraktion Transgene Zelllinien und primäre Hepatozyten Leberschnitte isolierte perfundierte Leber
Isolierung von Metaboliten	CYP oder UGT Supersome NAT Cytosol Mikrosomen und Cytosol S9-Fraktion
Arzneistoff-Wechselwirkung	Mikrosomen oder Cytosol CYP oder UGT Supersome oder NAT Cytosol primäre Hepatozyten
Einfluss genetischer Polymorphismen	Supersome Mikrosomen und Cytosol primäre Hepatozyten
Toxizität der Metabolite	primäre Hepatozyten (transgene) Zelllinien

**Tab. 6.11.** Übersicht der verschiedenen *in vitro*-Modelle je nach Forschungsschwerpunkt in Anlehnung an Lit..<sup>203</sup>

**Tab. 6.11** veranschaulicht, welches *in vitro*-Modell, je nachdem welcher Aspekt der Biotransformation im Vordergrund der Forschung steht, dem jeweils anderen vorzuziehen ist.<sup>203</sup>

Abschließend kann gesagt werden, dass trotz der Tatsache, dass *in vitro*-Modelle eine isolierte Betrachtungsmethode darstellen und somit die Komplexität eines ganzen Organismus nicht vollständig erfassen können, sie aber aufgrund ihrer leichten Handhabung eine gute Möglichkeit bieten, einzelne Parameter zu erfassen, besonders in Hinblick auf die Identifikation der Metabolite (qualitative Analyse).<sup>193,195,206</sup> Rückschlüsse auf die Pharmakokinetik sind natürlich nicht ohne weiteres auf die *in vivo*-Situation zu interpolieren.<sup>206</sup>

## 6.2 *In vitro*-Metabolisierung im mikrosomalen Inkubationssystem

Die Entwicklung einer Verbindung zu einem potenziellen Arzneistoff hängt stark von seinem pharmakokinetischen Profil ab. Eine schnelle Biotransformation führt zu einer kurzen Verweilzeit der pharmakologisch aktiven Substanz am gewünschten Target. Die Kenntnis über die dabei entstehenden Metabolite ist bezüglich der Therapieeffizienz sowie der Sicherheit des applizierten Arzneistoffs von entscheidender Bedeutung.

Nachdem die Verbesserung der Wasserlöslichkeit der Leitverbindung Marbostat-100 (**13a**) durch Derivatisierung (**13h**) zu keiner Beeinträchtigung der inhibitorischen Fähigkeit führte (s. Kap. 4.2.1 und Kap. 5.2.2), wurde die Verbindung **13h** der Metabolisierungsstudie unterzogen.

Im Hinblick auf eine geplante *in vivo*-Studie mit oraler Applikation des HDACi **13h** sollte zunächst die metabolische Stabilität dieser Verbindung untersucht werden. Erkenntnisse aus dieser Studie würden sich dann aufgrund des ähnlichen Grundkörpers auf das Marbostat-100 (**13a**) übertragen lassen.

Aus der Literatur geht hervor, dass Hydrolyse-Reaktionen in der Phase I und O-Glucuronidierungen in der Phase II zu den Hauptbiotransformationswegen vieler Hydroxamsäure-haltiger HDACi zählen.<sup>212</sup> Daher wurde unter Berücksichtigung dessen die Auswahl des *in vitro*-Testsystems getroffen. Um einen ersten Überblick über die Metabolisierung und zur Identifikation der Metabolite zu erhalten, erschienen die HLMs (s. Kap. 6.1.8) als *in vitro*-Modell am geeignetsten zu sein.

### 6.2.1 Das metabolische Inkubationssystem

Das Inkubationssystem (s. Kap. 10.6.1; **Tab. 10.11**), welches zur Nachahmung der *in vitro*-Biotransformation herangezogen wurde, sollte neben einer separaten Analyse der Phase I und Phase II nach Zugabe der entsprechenden Cofaktoren (NADPH bzw. NADPH-Regenerationssystem und UDPGA) auch eine duale Betrachtung gewährleisten können. Zur Aktivierung der UGTs im Rahmen der Phase II-Metabolisierung wurde neben dem Elektronenüberträger (UDPGA) des Weiteren das porenbildende Peptid Alamethicin benötigt.<sup>213</sup> Dieser Zusatz ist darin begründet, dass zwar sowohl CYPs als auch UGTs in der Membran des ER lokalisiert sind, der Unterschied jedoch in der Ausrichtung der aktiven Seite

zu finden ist.<sup>213</sup> Während diese bei den CYPs in Richtung des Cytosols zeigt, weist jene bei den UGTs eine lumenale Orientierung auf.<sup>213</sup> In intakten Zellen können sowohl das UDPGA als auch das Substrat mittels Transporter diese Barriere überqueren, welche jedoch in den HLMS fehlen.<sup>213</sup> Trotzdem kann auch bei Verwendung von Mikrosomen als *in vitro*-Testmodell eine duale Aktivität (Phase I + Phase II) gewährleistet werden, da zahlreiche Literaturdaten belegen, dass Alamethicin seinerseits keinen Einfluss auf die CYP-Aktivität hat.<sup>213-215</sup> Um die physiologischen Bedingungen im Lumen des ER reflektieren zu können, wurden darüber hinaus der pH-Wert (Puffersystem, s. Kap. 10.6) angepasst sowie MgCl<sub>2</sub> zugegeben.<sup>214</sup> Die genaue Funktion von MgCl<sub>2</sub> ist derzeit noch nicht geklärt, es wird jedoch angenommen, dass die Interaktion zwischen den in der ER-Membran befindlichen Proteinen durch die Bindung von zweiwertigen Kationen abgeschwächt und damit eine optimale Orientierung für den Elektronentransfer geschaffen wird.<sup>216</sup> Daten aus der Literatur belegen, dass ein Inkubationssystem mit MgCl<sub>2</sub> eine höhere Enzymaktivität aufweist, als jenes ohne.<sup>214</sup>

### **6.2.2 Auswahl der Positivkontrolle**

Ergebnisse, die aus einem mikrosomalen Testsystem gewonnen werden, unterliegen, je nachdem von welchem Hersteller die Mikrosomen bezogen werden und je nach verwendetem Inkubationssystem für die Metabolisierung (pH-Wert-Abweichungen, Einfluss von organischen Lösungsmitteln etc.), immer einem gewissen Schwankungsbereich.<sup>197,206</sup> Um diesen Bereich möglichst gering zu halten, wurde anstelle von einem HDACi 7-Ethoxycoumarin (7-EC) als Positivkontrolle gewählt, da diese Verbindung bereits unter gleichen Bedingungen getestet wurde und somit eine Vergleichbarkeit gegeben ist. Der finanzielle Aspekt ist ein weiterer Vorteil des 7-EC gegenüber einem HDACi.

Die Positivkontrolle dient der Prüfung der im Inkubationssystem enthaltenen metabolischen Enzyme hinsichtlich ihrer Aktivität und erlaubt damit die Qualität des Systems zu prüfen.

Da der Schwerpunkt der Metabolisierungsstudie auf der Identifikation von Phase I- und Phase II-Metaboliten lag, eignete sich 7-EC als Positivkontrolle gut, da es ebenfalls über beide Wege metabolisiert wird und zudem dessen Metabolite ausreichend in der Literatur dokumentiert sind.<sup>205,214,217-219</sup>

## 6.3 Ergebnisse

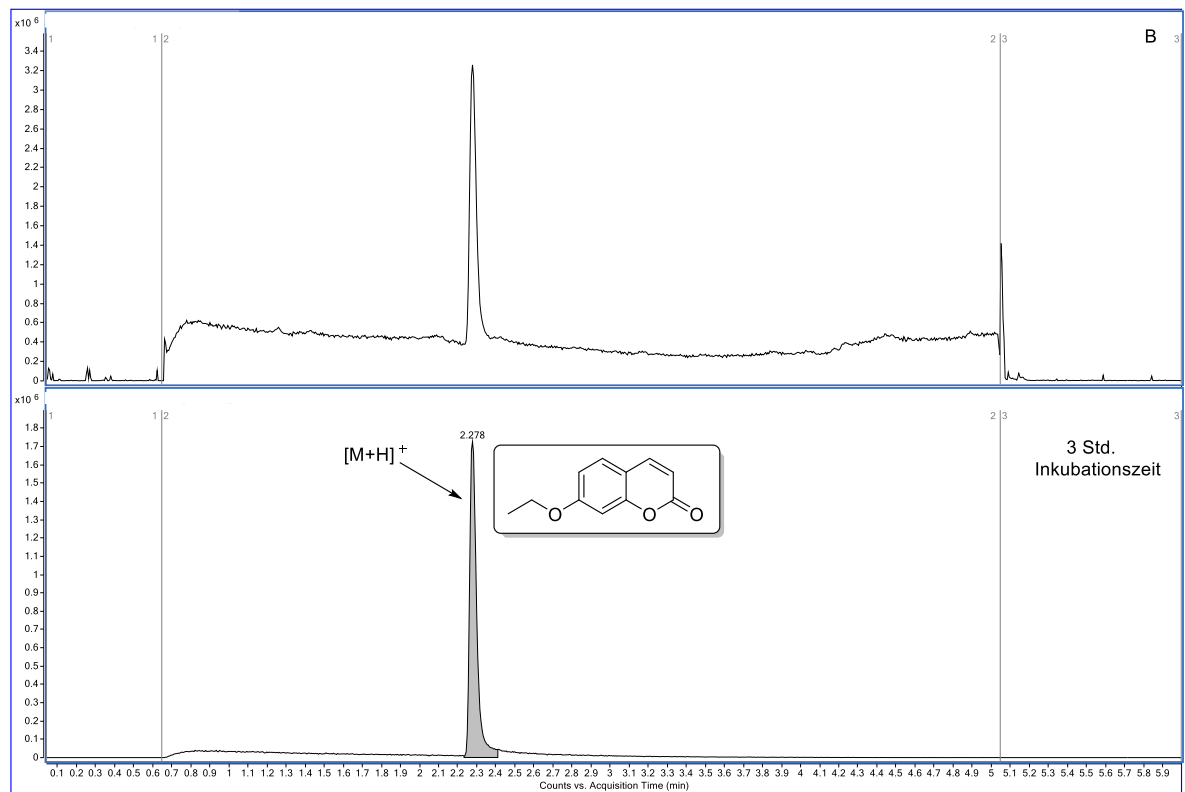
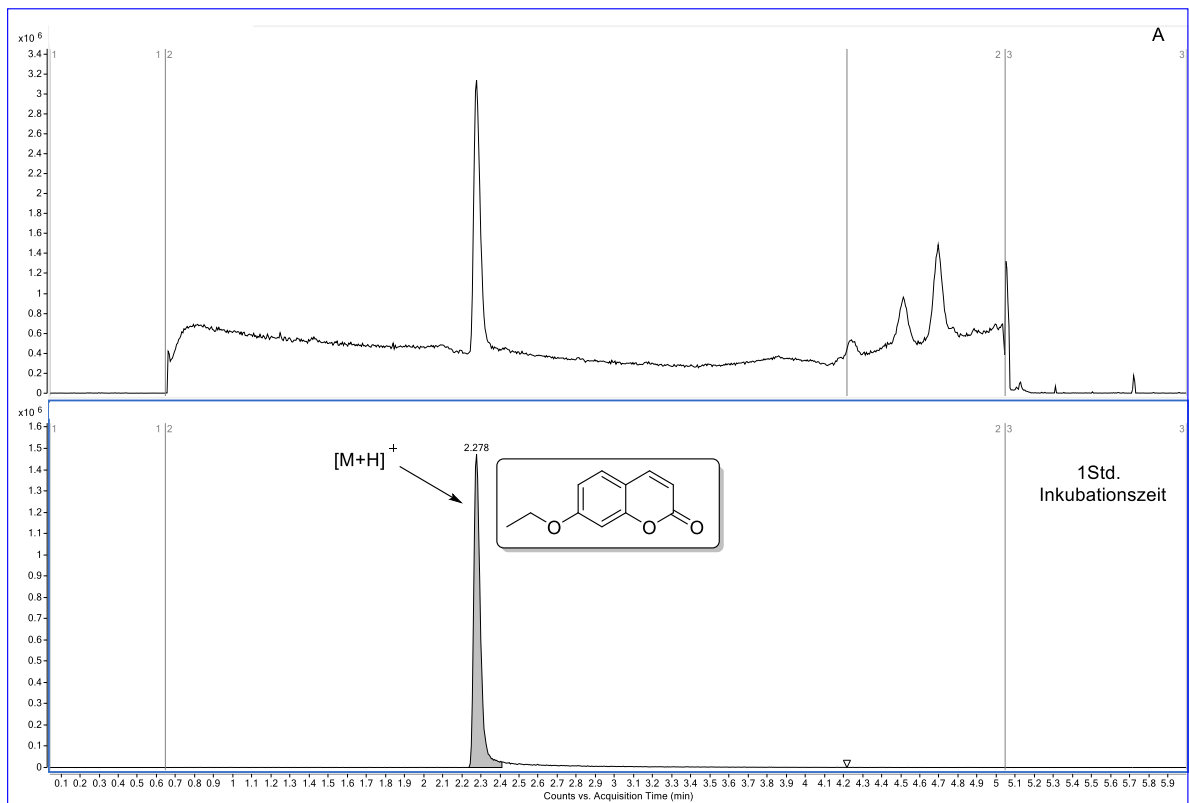
Die Durchführung der *in vitro*-Metabolisierungsstudie erfolgte in Anlehnung an die in der Dissertation von Dr. Katharina Zenger (Lehrstuhl Pharmazeutische Biologie, Universität Regensburg) beschriebene Arbeitsvorschrift (s. Kap. 10.6). Zunächst wurde die Enzymaktivität des Inkubationssystems anhand der Positivkontrolle geprüft, bevor die eigentliche Testverbindung hinsichtlich ihrer Biotransformation getestet wurde.

Um fehlerhafte Rückschlüsse aufgrund von unspezifischen Reaktionen oder Instabilitätsproblemen zu vermeiden, wurden stets bei jedem Metabolisierungsexperiment Negativkontrollen (s. Kap. 10.6) vermessen und die Stabilität der Testverbindung im Puffersystem (s. Kap. 10.6) geprüft. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die graphische Darstellung der Negativkontrollen verzichtet.

Wie bereits in Kap. 6.2.2 beschrieben, wurde der Fokus auf die Identifizierung der Metabolite gelegt, weshalb kein interner Standard bei der Massenspektrometrie vermessen wurde. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Methoden gewährleisten zu können, wurde der relative Bezug zum Ausgangsmaterial anhand der Integration der Peakflächen gewählt. Die Ausgangsverbindung wurde vor jedem Metabolisierungsversuch stets separat gemessen, um den 100 % Wert ermitteln zu können. Die Messungen für die im Folgenden gezeigten massenspektroskopischen Ergebnisse wurden von Josef Kiermaier (Abteilung für Massenspektrometrie der Universität Regensburg) durchgeführt.

### 6.3.1 Der Einfluss der Inkubationszeit auf die Metabolisierung von 7-EC

Der Vorschrift von Dr. Zenger folgend (s. Kap. 10.6), sollte die Inkubationszeit für das 7-EC 1 Std betragen. Die dabei resultierenden Metabolite entsprachen denen, die in der Literatur beschrieben werden,<sup>215,217</sup> jedoch war die relative Menge im Vergleich zur Startverbindung sehr gering (s. **Abb. 6.11** (A)). Aus diesem Grund wurde die von Dr. Zenger beschriebene Vorgehensweise sowie der Aufbau des Inkubationssystems beibehalten aber die Inkubationszeit (3 Std) modifiziert. **Abb. 6.11** (B) zeigt, dass diese Modifikation keine negative Auswirkung auf die Stabilität der Verbindung (7-EC) hat.



**Abb. 6.11.** Einfluss der Inkubationsverlängerung auf die Stabilität von 7-EC. A) Inkubationszeit beträgt 1 Std B) Inkubationszeit beträgt 3 Std.

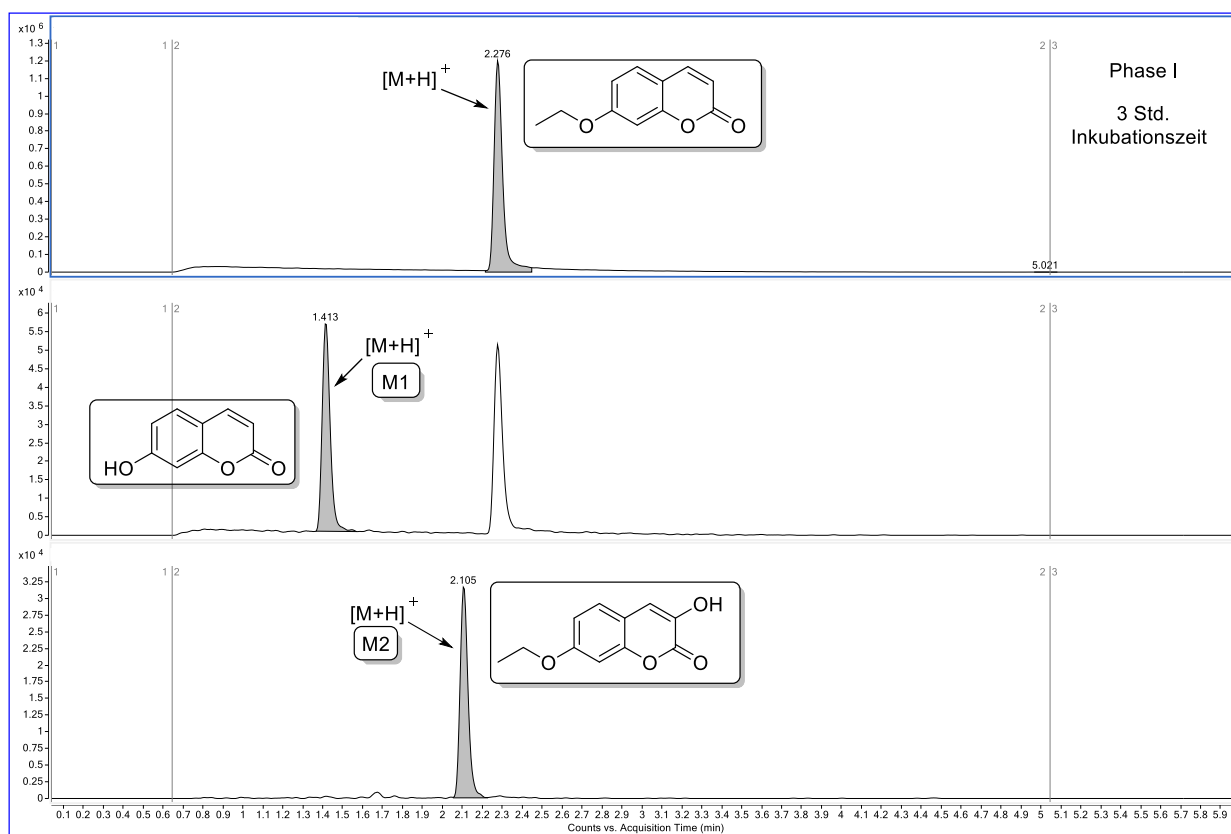
Stabilität	Inkubationszeit	RT [min]	Molekulargewicht	$m/z$ [M+H] gefunden	$m/z$ [M+H] berechnet	Summenformel	Peakfläche
7-EC	1 Std.	2,278	190,0630	191,0705	191,0703	$C_{11}H_{10}O_3$	3.614.161,35
7-EC	3 Std.	2,278	190,0630	191,0704	191,0703	$C_{11}H_{10}O_3$	4.510.173,01

**Tab. 6.12.** Darstellung der massenspektrometrischen Daten zur **Abb. 6.11.**

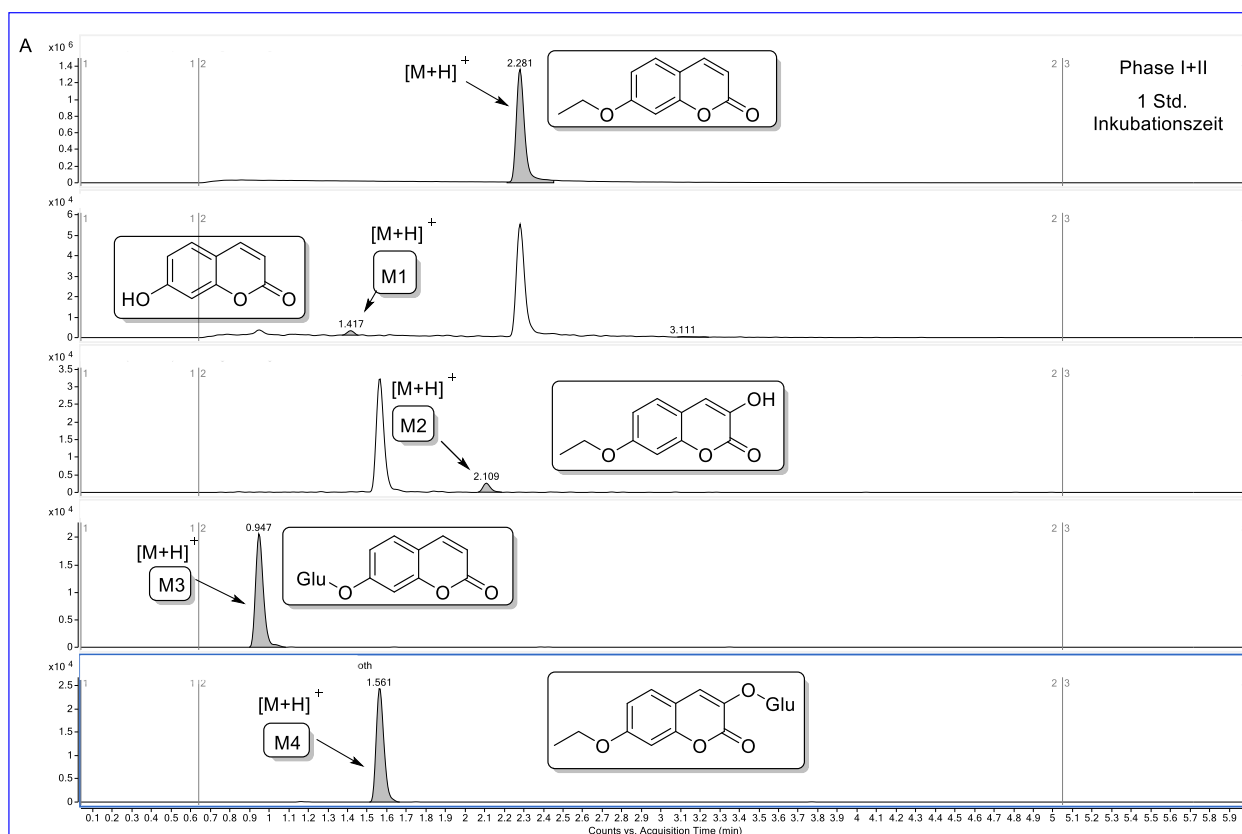
Um herauszufinden, ob mit der Verlängerung der Inkubationszeit auch eine relative Steigerung der Umsetzung (Ausgangssubstanz → Metabolit) erfolgt, wurden die Ergebnisse der Phase I und Phase I + II miteinander verglichen. Nach experimenteller Durchführung der Phase II-Metabolisierung wurde diese aus der Betrachtung (1 Std. vs. 3 Std.) herausgenommen, da keine reaktiven Gruppen im Molekül vorlagen, die eine Glucuronidierung ermöglichten und somit keine Metabolite nachweisbar waren.



**Abb. 6.12.** Phase I-Metabolisierung des 7-EC bei einer Inkubationszeit von 1 Std.

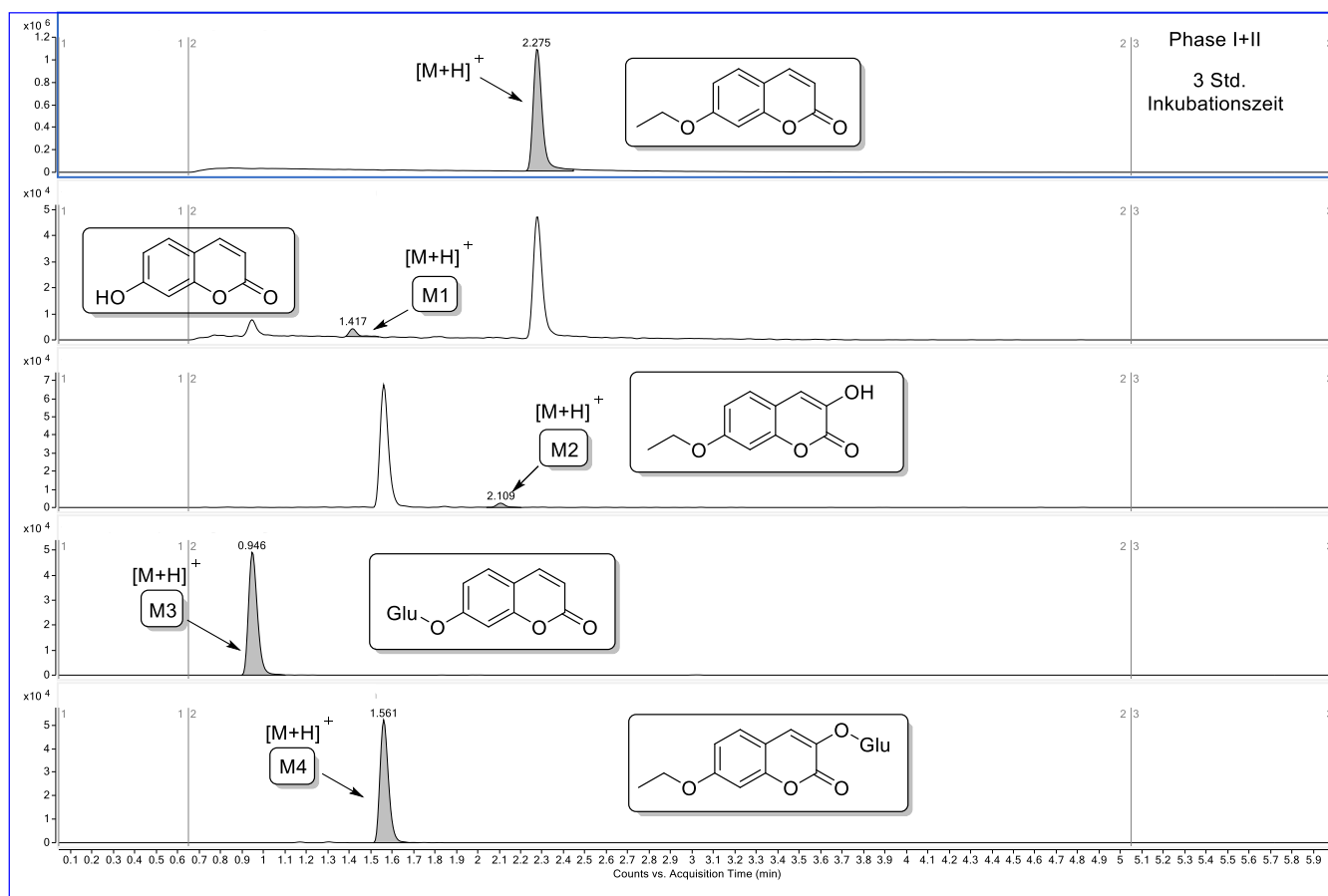


**Abb. 6.13.** Phase I-Metabolisierung des 7-EC bei einer Inkubationszeit von 3 Std.



**Abb. 6.14.** Phase I + II -Metabolisierung des 7-EC bei einer Inkubationszeit von 1 Std.





**Abb. 6.15.** Phase I + II -Metabolisierung des 7-EC bei einer Inkubationszeit von 3 Std.

Phase I	Inkubationszeit	RT [min]	Molekulargewicht	m/z [M+H] gefunden	m/z [M+H] berechnet	Summenformel	Peakfläche	Peakflächen [%] in Bezug auf 7-EC
7-EC	1 Std.	2,280	190,0630	191,0704	191,0708	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	4.155.917,54	100
7-EC	3 Std.	2,276	190,0630	191,0703	191,0708	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	3.654.450,63	100
M1	1 Std.	1,411	162,0317	163,0389	163,0395	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	75.605,57	1,82
M1	3 Std.	1,413	162,0317	163,0390	163,0395	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	156.518,05	4,28
M2	1 Std.	2,108	206,0579	207,0652	207,0657	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	58.987,22	1,42
M2	3 Std.	2,105	206,0579	207,0652	207,0657	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	87.390,52	2,39

Phase I+II	Inkubationszeit	RT [min]	Molekulargewicht	m/z [M+H] gefunden	m/z [M+H] berechnet	Summenformel	Peakfläche	Peakflächen [%] in Bezug auf 7-EC
7-EC	1 Std.	2,281	190,0630	191,0704	191,0703	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	4.186.716,95	100
7-EC	3 Std.	2,275	190,0630	191,0703	191,0703	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	3.246.980,19	100
M1	1 Std.	1,417	162,0317	163,0389	163,0390	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	5.215,79	0,13
M1	3 Std.	1,417	162,0317	163,0388	163,0390	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	7.829,74	0,24
M2	1 Std.	2,109	206,0579	207,0647	207,0652	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	6.942,10	0,17
M2	3 Std.	2,109	206,0579	207,0650	207,0652	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	7.245,49	0,22
M3	1 Std.	0,947	338,0638	339,0711	339,0711	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	57.244,96	1,37
M3	3 Std.	0,946	338,0638	339,0712	339,0711	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	141.934,04	4,37
M4	1 Std.	1,561	382,0900	383,0973	383,0973	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	67.256,03	1,61
M4	3 Std.	1,561	382,0900	383,0973	383,0973	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	143.820,85	4,43

**Tab. 6.13.** Ergebnisse der LC-MS, ESI<sup>+</sup>-Messung für Phase I und Phase I + II.

**Tab. 6.13** zeigt, dass mit längerer Inkubationszeit eine relative Steigerung der Metabolitmenge erfolgt. Damit lässt sich die zuvor formulierte Annahme bestätigen. Obwohl die gleiche Konzentration (250 µM) an 7-EC bei allen Experimenten (Phase I und Phase I + II) eingesetzt wurde, fällt bei einem Vergleich der relativen Werte der Metabolite (M1-M4) auf, dass, bezogen auf die Startverbindung, durch die längere Versuchszeit eine relative Zunahme zu verzeichnen ist (M1 (1 Std, 1,82 %) vs. M1 (3 Std, 4,28 %) und M3 (1 Std, 1,37 %) vs. M3 (3 Std, 4,37 %).

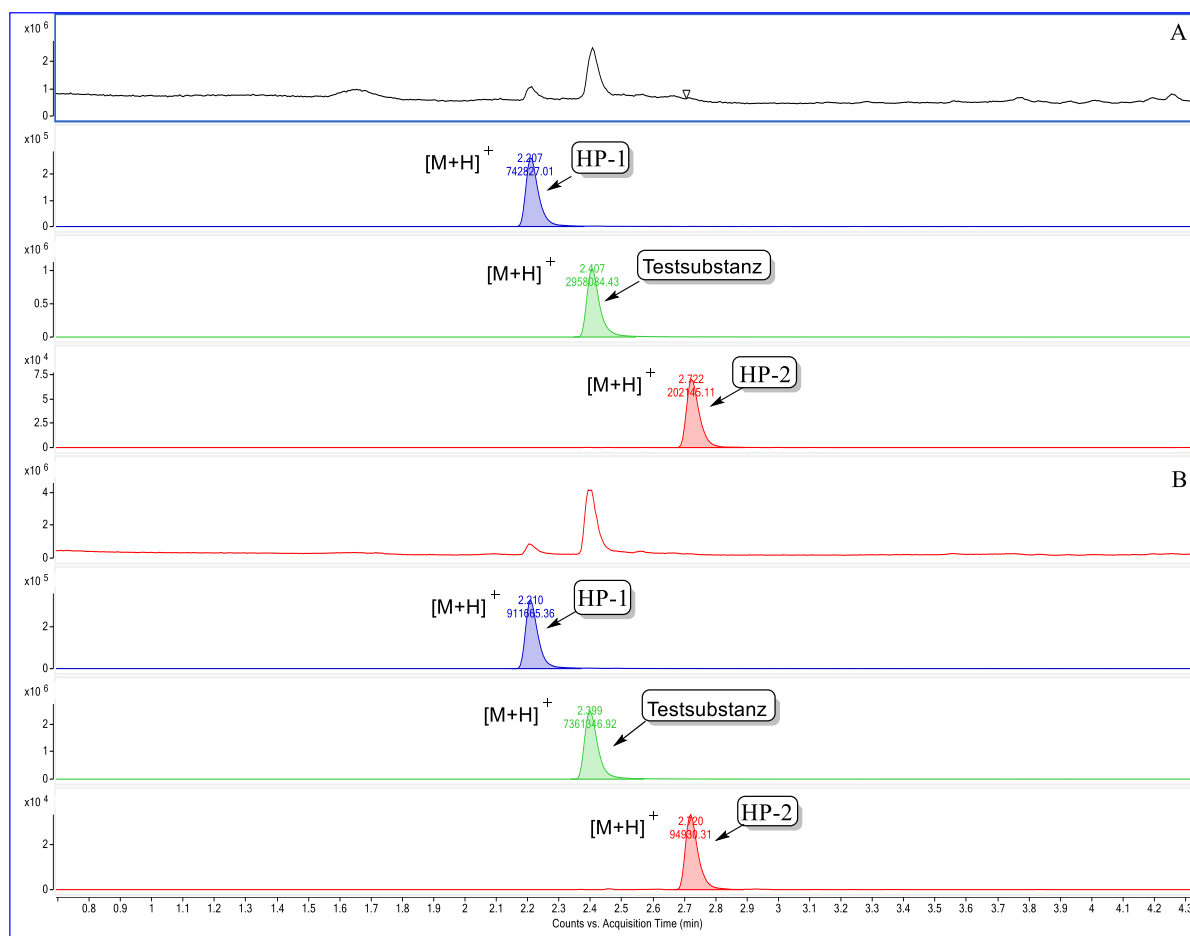
Aufgrund dieser Erkenntnis wurde, wenn nicht anders erwähnt, für die Metabolisierung der Testverbindung die Inkubationszeit auf 3 Std festgesetzt.

### **6.3.2 Der Einfluss von organischen Lösungsmitteln auf die Stabilität von 13h**

Vor Beginn der Metabolisierungsstudie wurde **13h** zunächst mittels präparativer HPLC (s. Kap. 10.6.3) gereinigt und im Anschluss die Reinheit mittels analytischer HPLC bestimmt (99,7 %, s. Kap. 10.6.4). Des Weiteren wurde anhand von Metabolisierungsdaten, die zu Hydroxamsäure-haltigen HDACi wie Trichostatin A (**2**) und SAHA (**1**) in der Literatur existieren,<sup>212,220</sup> eine Datenbank mit potenziellen Metaboliten für die Testverbindung angelegt (s. Kap. 10.6.5).

In Anlehnung an die Durchführung von Dr. Zenger, wurde die zu testende Verbindung ebenfalls in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, bevor sie zum Inkubationssystem gegeben wurde (s. Kap. 10.6). Daten aus der Literatur belegen jedoch, dass die Wahl der organischen Lösungsmittel entscheidend ist, da sich diese auf die CYP-Aktivität auswirken können.<sup>206,221,222</sup> DMSO, Methanol, Ethanol und Acetonitril gehören zu den am häufigsten verwendeten Lösungsmittel (LM), um die Löslichkeit der meist lipophilen Testverbindungen zu verbessern.<sup>222</sup> Sie können entweder direkt durch die Veränderung der natürlichen Umgebung oder aber durch die Zerstörung der Enzymeinheit auf die Enzyme einwirken und somit zu fehlerhaften Schlussfolgerungen führen.<sup>222</sup> Der Einfluss der genannten organischen Lösungsmittel auf die Enzymkinetik ist je nach betrachteter CYP-Isoform unterschiedlich stark ausgeprägt.<sup>222</sup> Im Allgemeinen wird empfohlen, die Konzentration dieser Lösungsmittel unter 1 % zu halten, um den Effekt möglichst gering zu halten.<sup>206</sup> Da die zu testende Verbindung wasserlöslich ist, konnte der Einfluss von DMSO auf deren Stabilität im Vergleich zu einer wässrigen Lösung untersucht werden.

Die Durchführung des Versuches entspricht der in Kap. 10.6.1 beschriebenen allgemeinen Vorschrift für die Stabilitätstestung.



**Abb. 6.16.** Lösungsmiteleinflüsse auf die Stabilität der Testsubstanz **13h**. (A) Testsubstanz **13h** wird in DMSO gelöst und für 3 Std im Kaliumphosphat-Puffer inkubiert. (B) Testsubstanz **13h** wird in H<sub>2</sub>O gelöst und für 3 Std im Kaliumphosphat-Puffer inkubiert. HP-1 und HP-2 stellen jeweils die beiden Hydrolyseprodukte dar.

Stabilität	Lösungsmittel	RT [min]	Molekulargewicht	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup> gefunden	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup> berechnet	Summenformel	Peakfläche	Peakfläche[%] in Bezug auf die Testsubstanz
Testsubstanz	DMSO	2,407	533,2274	534,2352	534,2347	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	2.958.084,43	100
Testsubstanz	Wasser	2,399	533,2274	534,2351	534,2347	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	7.361.346,92	100
HP-1	DMSO	2,207	551,2380	552,2460	552,2453	C <sub>28</sub> H <sub>33</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	742.827,01	25,11
HP-1	Wasser	2,210	551,2380	552,2461	552,2453	C <sub>28</sub> H <sub>33</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	202.146,11	12,38
HP-2	DMSO	2,722	518,2165	519,2240	519,2238	C <sub>28</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	911.665,36	6,38
HP-2	Wasser	2,720	518,2165	519,2238	519,2238	C <sub>28</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	94.930,31	1,29

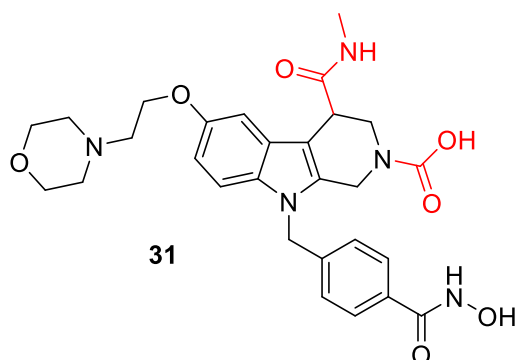
**Tab. 6.14.** Darstellung der massenspektrometrisch ermittelten Ergebnisse aus dem Experiment DMSO vs. H<sub>2</sub>O.

Aus dem Chromatogramm (s. **Abb. 6.16**) wird ersichtlich, dass die Verbindung sowohl in der DMSO-Lösung (A) als auch in der wässrigen Lösung (B) im Kaliumphosphat-Puffer des Inkubationssystems (s. Kap. 10.6.1) bei pH-Wert 7,4, ohne Einwirkung von jeglichen Enzymen, Instabilitäten aufweist. Unter Zuhilfenahme der Datenbank konnte mittels der Massenspektrometrie (LC-MS, ESI<sup>+/·</sup>) den beiden Hydrolyseprodukten (HP-1 und HP-2) jeweils ihre Struktur zugeordnet werden (s. Kap. 6.3.3).

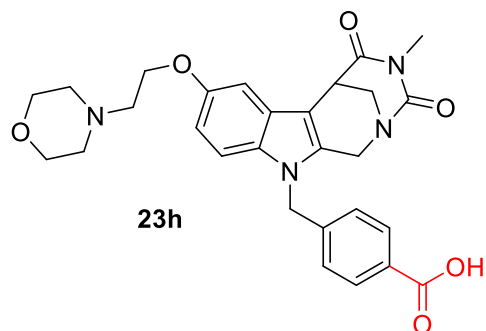
Bei einem Vergleich der beiden Experimente (DMSO vs. H<sub>2</sub>O) wird deutlich, dass zum einen im Chromatogramm A keine saubere Basislinie vorliegt (s. **Abb. 6.16**), welches in den Eigenschaften des DMSOs begründet ist (Lösungsvermittler). Zum anderen liegt eine höhere Instabilität der Testverbindung vor, als es im wässrigen Milieu der Fall ist (B) (HP-1 (DMSO, 25,11 %) vs. HP-1 (H<sub>2</sub>O, 12,38 %) und HP-2 (DMSO, 6,83 % vs. HP-2 (H<sub>2</sub>O, 1,29 %)). Da bei beiden Experimenten (s. **Abb. 6.16**) dasselbe Injektionsvolumen (0,5 µL), sowie die gleiche Konzentration (100 µM) an Testsubstanz **13h** vorlag, lässt sich ableiten, dass der Verzicht auf DMSO eine bessere Stabilität der Testverbindung gewährleistet. Daher wurde die Verbindung in der Folge immer frisch vor dem jeweiligen Experiment in H<sub>2</sub>O gelöst.

### 6.3.3 Strukturaufklärung der Hydrolyseprodukte (HP-1 und HP-2)

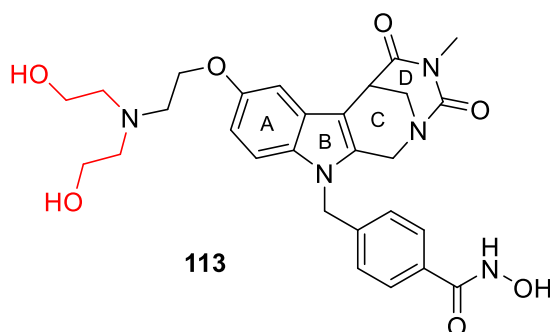
Zur Aufklärung der in Kap. 6.3.2 gefundenen Hydrolyseprodukte wurde die Datenbank (s. Kap. 10.6.5) hinsichtlich jener Verbindungen durchsucht, die ohne Einwirkung von Enzymen entstehen können. Anhand der gefundenen *m/z* [M+H]<sup>+</sup>- Werte und der Kenntnis aus der Synthese über labile Komponenten im Molekül konnten drei Verbindungen (s. **Abb. 6.17**) aus der Datenbank selektiert werden:



Summenformel:  $C_{28}H_{33}N_5O_7$   
exakte Masse: 551,2380



Summenformel:  $C_{28}H_{30}N_4O_6$   
exakte Masse: 518,2165



Summenformel:  $C_{28}H_{33}N_5O_7$   
exakte Masse: 551,2380

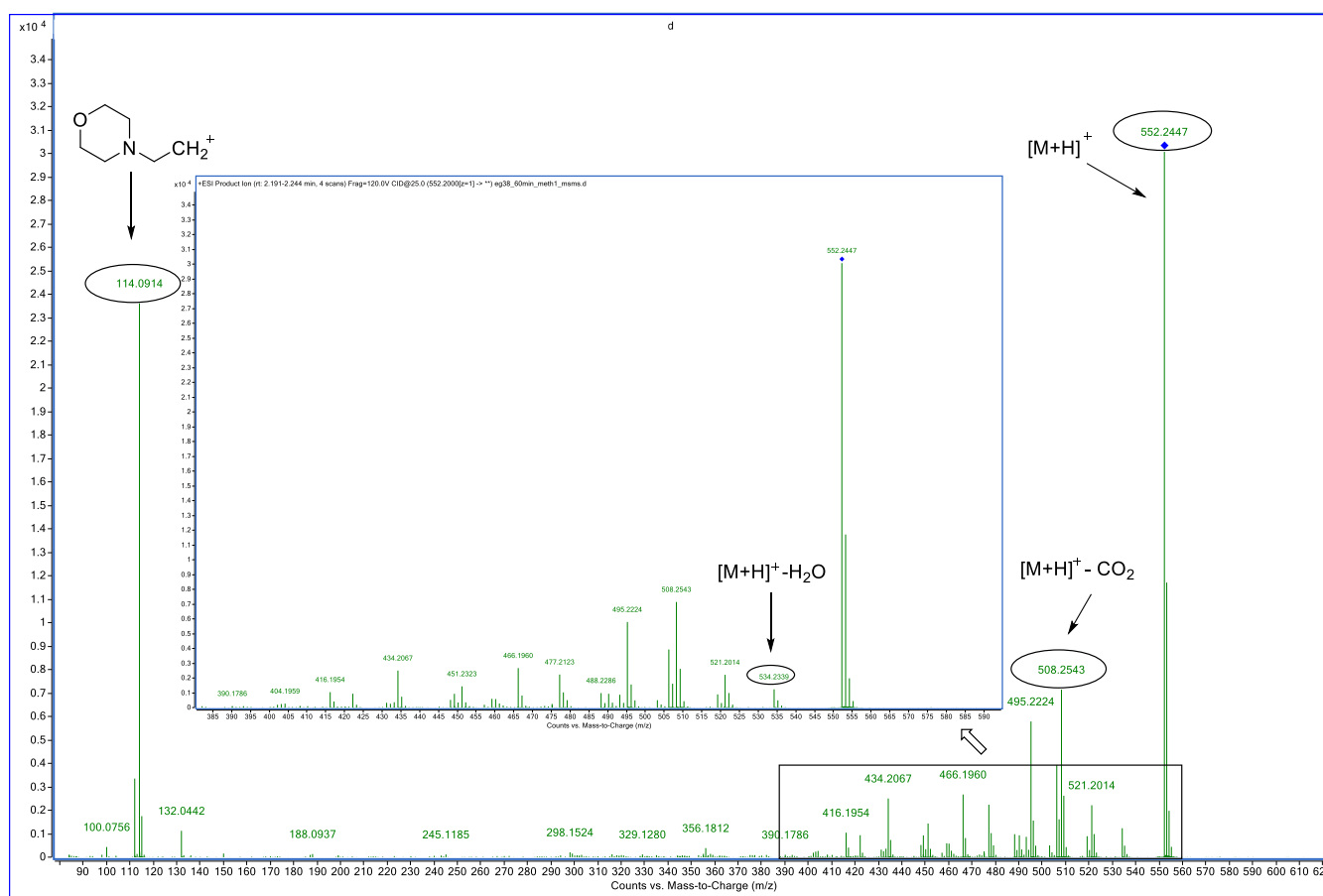
**Abb. 6.17.** Überblick über die möglichen Strukturen für die Hydrolyseprodukte (HP-1, HP-2).

Aufgrund der Tatsache, dass sowohl die Summenformel, als auch der gefundene  $m/z$   $[M+H]^+$ -Wert mit dem berechneten Wert übereinstimmen, kann dem Hydrolyseprodukt 2 (HP-2) die Verbindung **23h** zugeordnet werden. Eine Isolierung von HP-2 zur Aufnahme eines NMR-Spektrums war aufgrund der geringen Menge nicht möglich. Daher wurde zur zusätzlichen Sicherung die Verbindung **23h**, die im Rahmen der Synthese der Testsubstanz synthetisiert wurde (s. Kap. 3.2), in der Massenspektrometrie vermessen, um die Retentionszeiten (HP-2 vs. Verbindung **23h**) miteinander vergleichen zu können. Ein Abgleich der Retentionszeiten bestätigte, dass HP-2 der Verbindung **23h** entsprach.

Obwohl sowohl Literaturdaten, als auch das Ergebnis dieses Experiments bestätigen, dass Hydroxamsäuren gegenüber höheren Temperaturen und niedrigen pH-Werten empfindlich sind, zählen diese Verbindungen, zu den potentesten innerhalb der Klasse der HDACi.<sup>223-225</sup> Dies ist in der Zink-chelatisierenden Eigenschaft der Hydroxamsäure begründet.<sup>223</sup> Eine

Verringerung der Temperatur sowie Durchführung der Metabolisierung im basischen Milieu zur Steigerung der Stabilität der Hydroxamsäure, waren angesichts des verwendeten mikrosomalen Testsystems nicht möglich. Dies ist einerseits darin begründet, dass die Metabolisierung den physiologischen Bedingungen (Körpertemperatur, pH-Wert in der Leber) entsprechen sollte und andererseits nur bei diesen Bedingungen die Funktionsfähigkeit der Enzyme gewährleistet werden kann.

Die Aufklärung der Struktur von HP-1 gestaltete sich schwieriger, da aufgrund der gleichen Summenformel und Masse sowohl **31**, als auch **113** (s. **Abb. 6.17**) in Frage kamen. Daher wurde eine MS-MS-(ESI<sup>+</sup>)-Messung durchgeführt, um Rückschlüsse über die Fragmentierung zu erhalten.



**Abb. 6.18.** MS-MS-Messung zur Strukturaufklärung von HP-1.

Summenformel	$m/z$ [ $M^+$ ] gefunden	$m/z$ [ $M^+$ ] berechnet
$C_{28}H_{34}N_5O_7$	552,2447	552,2453
$C_{27}H_{34}N_5O_5$	508,2543	508,2554
$C_6H_{12}NO$	114,0914	114,0913

**Tab. 6.15.** Darstellung der wesentlichen Fragment-Ionen.

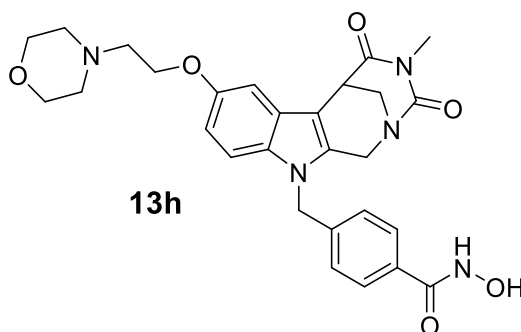
Wie **Abb. 6.18** zeigt, konnte man anhand des Fragmentmusters eindeutig zuordnen, dass es sich bei HP-1 um **31** handeln muss.

Dabei wurde wie folgt vorgegangen: Die Abspaltung von einem Wassermolekül zu  $m/z$  534,2339 ist sowohl bei **31**, als auch bei **113** möglich, wodurch eine Zuordnung anhand dieses Fragmentes entfällt. Das Fragment-Ion ( $m/z$  508,2543) zeigt eine Abspaltung von  $CO_2$ , somit kann es sich nicht um **113** handeln, da bei dieser anstelle von  $CO_2$  ein  $CH_2OH$  abgespalten werden müsste. Des Weiteren zeigt das Fragment-Ion ( $m/z$  114,0914), dass ein intaktes Morpholin-Kation vorliegt welches ein weiterer Beleg dafür ist, dass es sich bei HP-1 um **31** handeln muss.

Da die Testsubstanz **13h** eine Reinheit von 99,74 % aufwies, konnte ausgeschlossen werden, dass die als Hydrolyseprodukte bezeichneten Verbindungen aus der Synthese stammen (s. Kap. 10.6.4).

Um festzustellen, ob die Hydrolyseprodukte (HP-1 und HP-2) der Testsubstanz ebenfalls eine inhibitorische Wirkung auf das HDAC-Enzym aufweisen, wurden diese im Zellsystem getestet (s. Kap. 5.2.5). Die Synthese der beiden Verbindungen ist in Kap. 3.2 beschrieben.

#### 6.3.4 Der Einfluss der „Stopplösung“ auf die Stabilität der Testsubstanz **13h**

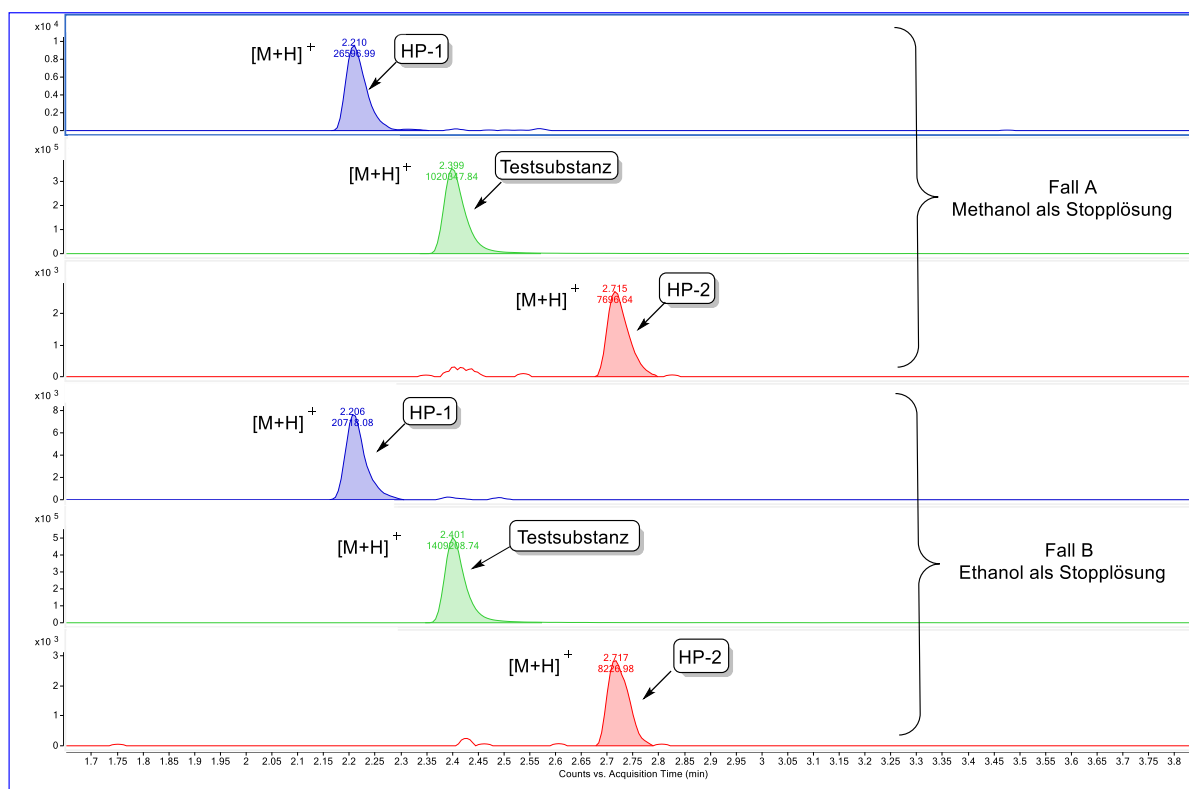


Summenformel: C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>

Nachdem geklärt werden konnte, welches LM zum Lösen der Substanz herangezogen werden sollte, musste vor dem Start der Metabolisierungsstudie eine geeignete „Stopplösung“ gefunden werden. Als „Stopplösung“ wird jene Lösung bezeichnet, die die Enzymaktivität stoppt und somit zum Beenden der Metabolisierung herangezogen wird. Bei der Wahl des Lösungsmittels, welches als „Stopplösung“ fungieren sollte, musste darauf geachtet werden, dass sich sowohl die Testsubstanz **13h**, als auch ihre Metabolite darin lösen. Zur Orientierung wurde das Löslichkeitsverhalten der Testsubstanz **13h** herangezogen, da die Metabolite noch nicht bekannt sind und jene meist eine bessere Löslichkeit (in Methanol oder Ethanol) im Vergleich zum Startmaterial aufweisen. Hierfür sind verschiedene Lösungsmittel in der Literatur beschrieben<sup>220,226</sup>, wobei in Anlehnung an die Dissertation von Dr. Zenger und dem Protokoll der Firma Thermo Fisher (Hersteller, bei dem die humanen Lebermikrosomen bezogen wurden), die Wahl auf Methanol fiel. Als Vergleichslösemittel wurde Ethanol gewählt, um zu prüfen, ob bei der Wahl der „Stopplösung“ neben dem Aspekt der Löslichkeit auch dessen Einfluss auf die Stabilität der Testverbindung eine Rolle spielt. Die Löslichkeit von **13h** ist in beiden Lösungsmitteln gleichermaßen gegeben.

Für die Durchführung des Vergleiches wurde die wässrige Testsubstanzlösung (100 µM) zum Inkubationssystem, welches nur aus Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) bestand, gegeben und für drei Std bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde im Fall A die Enzymreaktion mit Methanol und im Fall B mit Ethanol gestoppt (s. **Abb. 6.19**). Mittels Zentrifugation (14.000 rpm, 5 min) konnten die Proteine abgetrennt werden und der Überstand der massenspektrometrisch analysiert werden.



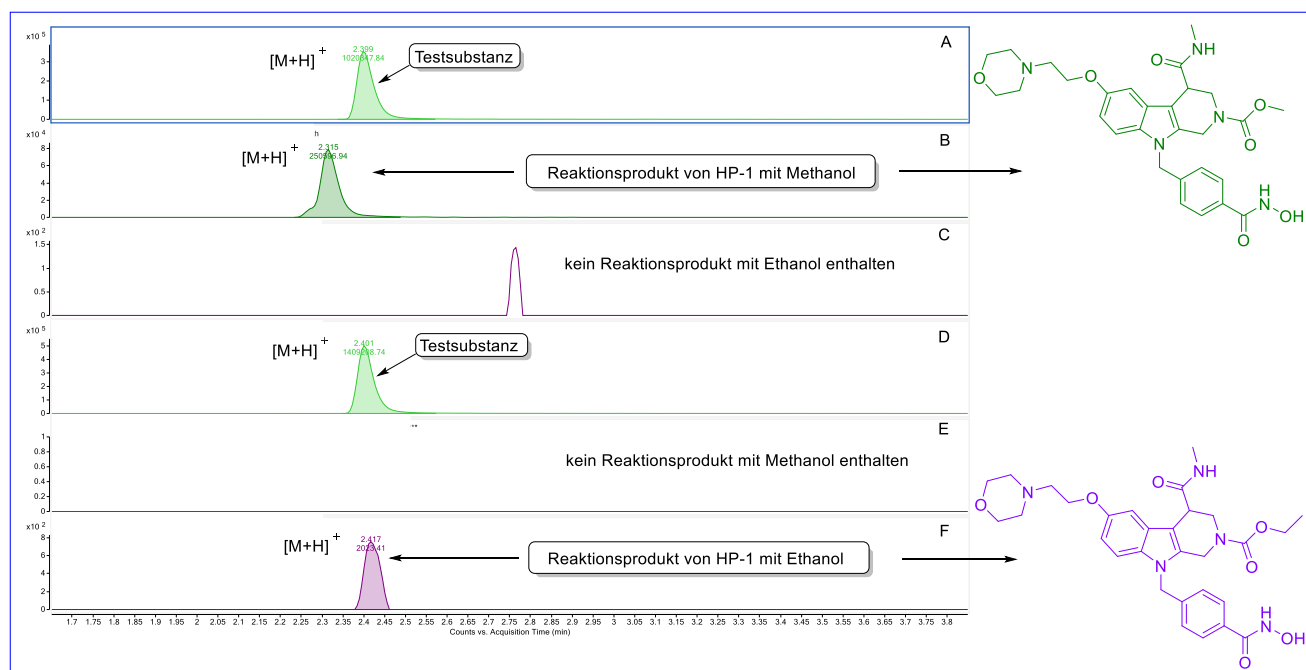


**Abb. 6.19.** Einfluss der „Stopplösung“ auf die Stabilität der Testsubstanz **13h** im Kaliumphosphat-Puffer. Fall A zeigt das Ergebnis bei Verwendung von Methanol als „Stopplösung“. Fall B zeigt das Ergebnis bei Verwendung von Ethanol.

**Abb. 6.19** zeigt, die bereits aus Kap. 6.3.2 bekannten Hydrolyseprodukte (HP-1 und HP-2). Bei Betrachtung der relativen Werte (s. **Tab. 6.16**) ist die Auswirkung der beiden „Stopplösungen“ auf HP-1 und HP-2 um einiges geringer als jene von DMSO (s. **Tab. 6.14**).

MeOH vs. EtOH in Bezug auf die Stabilität	Stopplösung	RT [min]	Molekulargewicht	$m/z$ $[M+H]^+$ gefunden	$m/z$ $[M+H]^+$ berechnet	Summenformel	Peakfläche	Peakfläche[%] in Bezug auf die Testsubstanz
Testsubstanz	MeOH	2,399	533,2274	534,2353	534,2347	$C_{28}H_{31}N_5O_6$	1.020.347,84	100
Testsubstanz	EtOH	2,401	533,2274	534,2355	534,2347	$C_{28}H_{31}N_5O_6$	1.409.208,74	100
HP-1	MeOH	2,210	551,2380	552,2453	552,2453	$C_{28}H_{33}N_5O_7$	26.596,99	2,61
HP-1	EtOH	2,206	551,2380	552,2453	552,2453	$C_{28}H_{33}N_5O_7$	20.718,08	1,47
HP-2	MeOH	2,715	518,2165	519,2237	519,2238	$C_{28}H_{30}N_4O_6$	7.696,64	0,75
HP-2	EtOH	2,717	518,2165	519,2238	519,2238	$C_{28}H_{30}N_4O_6$	8.226,98	0,58

**Tab. 6.16.** Übersicht über die MS (LC-MS, ESI<sup>+</sup>)- Ergebnisse zum Einfluss der „Stopplösung“ auf die Stabilität.



**Abb. 6.20.** Darstellung der Nebenprodukte, die je nach verwendeter „Stopplösung“ entstehen können. Die Messung der Testsubstanz **13h** erfolgte für jeden Versuch separat (A) und (D). (B) und (F) zeigen die jeweiligen Reaktionsprodukte mit dem entsprechenden Alkohol (Methanol bzw. Ethanol). (C) und (E) zeigen nur jene Reaktionsprodukte, die der im Versuch eingesetzten „Stopplösung“ entsprachen.

MeOH vs. EtOH in Bezug auf die Bildung des Reaktionsproduktes	Stopplösung	RT [min]	Molekulargewicht	$m/z$ $[M+H]^+$ gefunden	$m/z$ $[M+H]^+$ berechnet	Summenformel	Peakfläche	Peakfläche[%] in Bezug auf die Testsubstanz
Testsubstanz	MeOH	2,399	533,2274	534,2354	534,2347	$C_{28}H_{31}N_5O_5$	1.020.347,84	100
Testsubstanz	EtOH	2,401	533,2274	534,2355	534,2347	$C_{28}H_{31}N_5O_5$	1.409.208,74	100
RP-1	MeOH	2,315	565,2536	566,2611	566,2609	$C_{29}H_{35}N_5O_7$	250.596,94	24,56
RP-2	EtOH	2,417	579,2693	580,2769	580,2766	$C_{30}H_{37}N_5O_7$	2.023,41	0,14

**Tab. 6.17.** Darstellung der MS (LC-MS, ESI<sup>+</sup>)-Ergebnisse zum Einfluss der „Stopplösung“ auf die Bildung von Reaktionsprodukten.

Abseits des Einflusses von HP-1 und HP-2 ist sowohl für Methanol als auch für Ethanol ein Beitrag zu weiteren Nebenprodukten (RP-1 und RP-2) zu verzeichnen (Chromatogramme B und F, Abb. 6.20). Dabei handelt es sich um Reaktionen zwischen HP-1 und dem jeweiligen „Stopplösemittel“, wobei diese bei Verwendung von Methanol - bezogen auf den Ausgangswert - deutlich höher ist (bei MeOH (RP-1, 24,56 %) vs. EtOH (RP-2, 0,14 %)). Um zu prüfen, ob die jeweiligen Reaktionsprodukte (mit Methanol (RP-1) oder Ethanol (RP-2)) tatsächlich von der gewählten „Stopplösung“ abhängen und nicht schon vorher in geringen Mengen in der Probe enthalten waren, wurde zusätzlich massenspektrometrisch nach den entsprechenden Massen gesucht.

Wie die Chromatogramme C und E in **Abb. 6.20** zeigen, konnten in den jeweiligen Experimenten jeweils immer nur jene Reaktionsprodukte gefunden werden, die der im Versuch eingesetzten „Stopplösung“ entsprachen.

Unter Einbeziehung der Erkenntnis der Reaktionsprodukte RP-1 und RP-2, lässt sich wiederum das vorher formulierte Ergebnis (geringer Einfluss von MeOH auf HP-1 und HP-2) revidieren. Während die Auswirkung von MeOH auf HP-2 vergleichbar mit der von Ethanol ist, liegt das durch MeOH verursachte Reaktionsprodukt (RP-1) in einer deutlich höheren Menge (25 % vom Ausgangsprodukt) vor. Die Reaktion von Ethanol mit HP-1 liegt hingegen in Bezug auf die Ausgangsverbindung unter 1 % (RP-2). Um zu vermeiden, dass Metabolite aufgrund von Überlagerungen der Retentionszeiten (Metabolit vs. Reaktionsprodukt von HP-1) übersehen werden, wird für die Metabolisierungsstudie Ethanol anstelle von Methanol verwendet.

### 6.3.5 Metabolisierungsstudie von **13h**

Anhand der gewonnenen Erkenntnisse aus den Vorversuchen wurde die Vorschrift von Dr. Zenger hinsichtlich der Inkubationszeit (1 Std -> 3 Std), „Stopplösung“ (MeOH -> EtOH), sowie die für die Herstellung der Testsubstanzlösung verwendeten Lösungsmittel (DMSO -> H<sub>2</sub>O) modifiziert. Die *in vitro*-Metabolisierungsstudie der Testsubstanz **13h** in humanen Lebermikrosomen erfolgte, bis auf die genannten Modifikationen, in Anlehnung an die von Dr. Zenger beschriebene Vorgehensweise (Methode 1, s. Kap. 10.6.1).

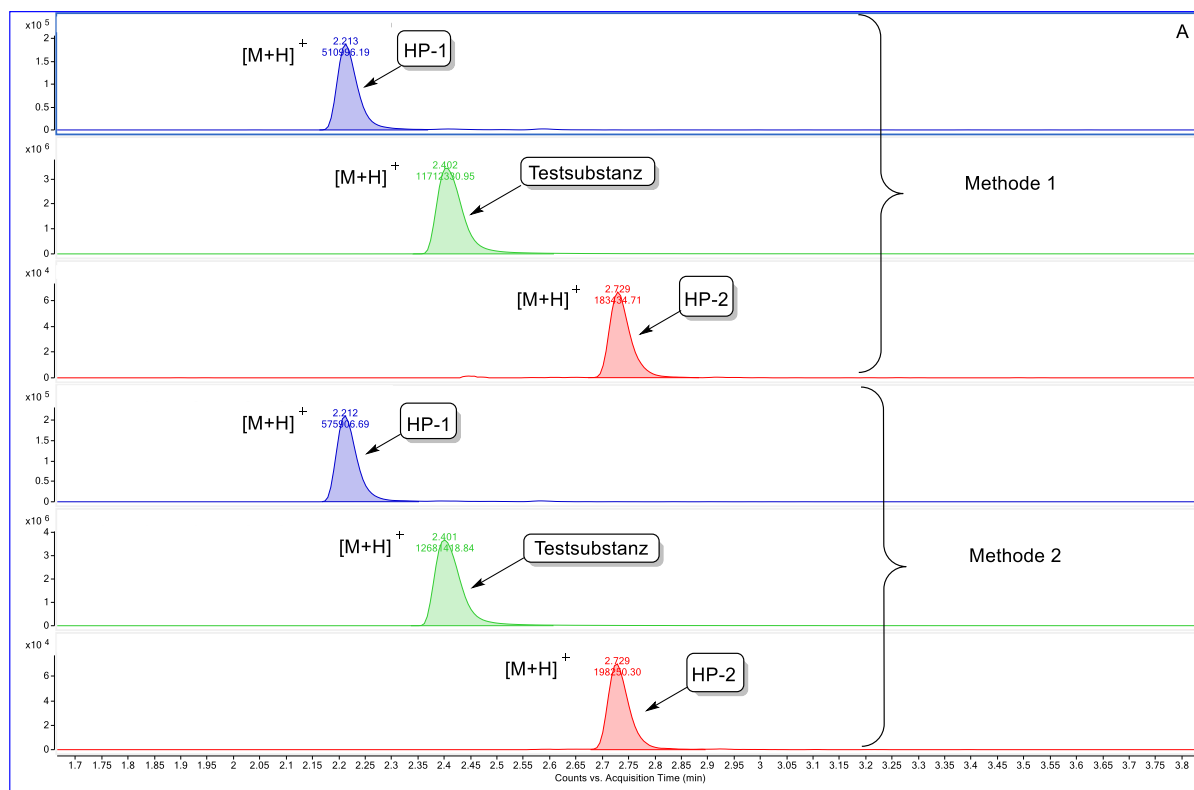
Dabei ließen sich, abseits der beiden bekannten Hydrolyseprodukte (HP-1 und HP-2), keine Metabolite der Testverbindung nachweisen. Weitere Veränderungen, wie eine erneute Verlängerung der Inkubationszeit (3 Std -> 6 Std) sowie die Erhöhung der Mikrosomen (0,5 mg/ mL -> 0,8 mg/ mL)- und Testsubstanzkonzentration (10 µM -> 100 µM), führten zu keiner nachweisbaren Metabolitbildung (Chromatogramme nicht abgebildet). Modifikationen betreffend dieser Faktoren waren damit ausgeschöpft. Zum einen aufgrund der begrenzten Löslichkeit der Testsubstanz **13h** bei gleichbleibendem Volumen des Inkubationssystems und steigender Konzentration und zum anderen sollte, laut Empfehlungen der Literatur, die Proteinkonzentration der Mikrosomen ( $\leq 0,5$  mg / mL) nicht überschritten werden, um das Risiko der Bindung potenzieller Metabolite an die Proteine gering zu halten.<sup>218</sup> Aus diesem Grund wurde bei beiden Experimenten (0,5 bzw. 0,8 mg / mL mikrosomale Proteinkonzentration) das Vorliegen einer möglichen Proteinbindung geprüft,

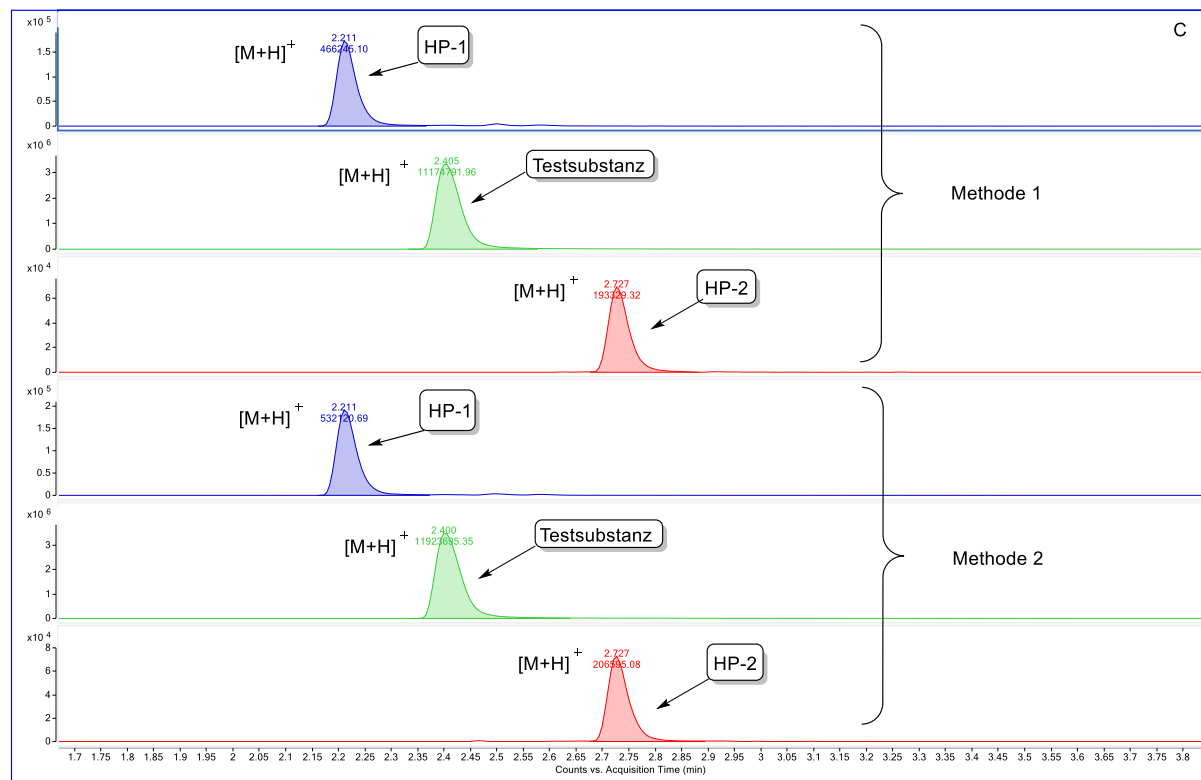
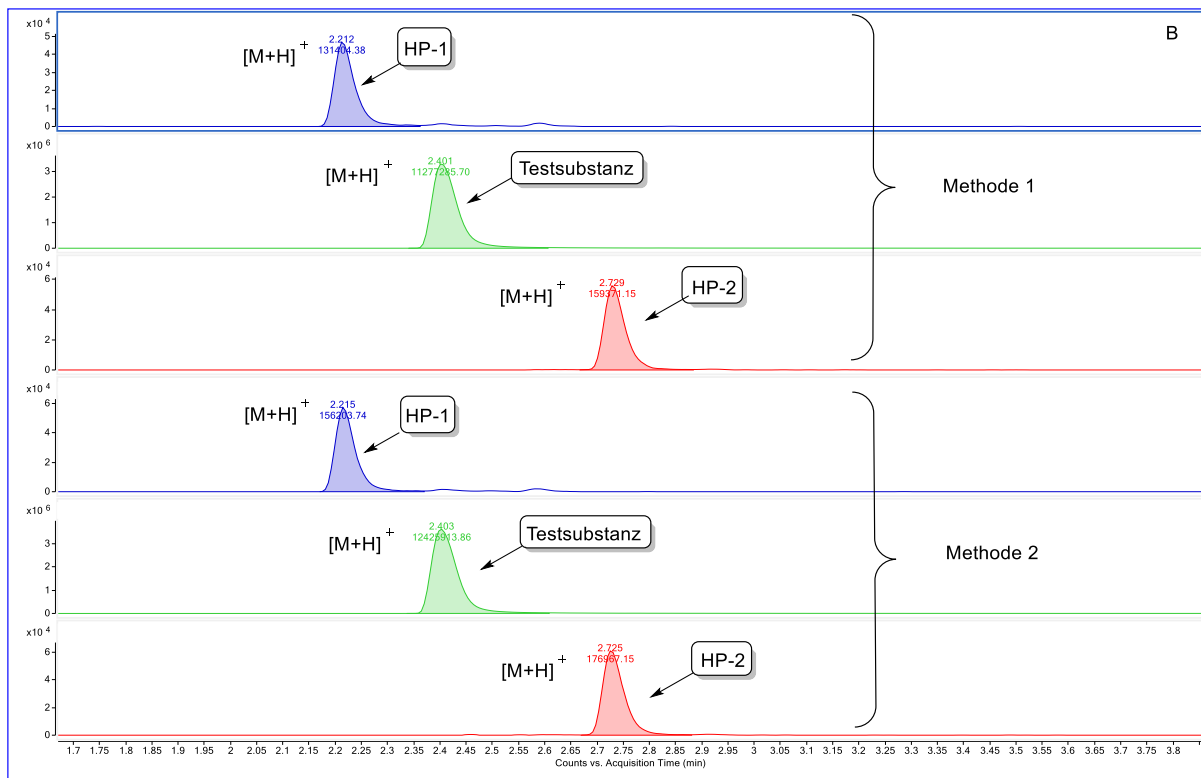
indem das nach der Zentrifugation erhaltende Pellet in Ethylacetat aufgenommen wurde. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand entnommen und wiederholt einer MS (LC-MS, ESI<sup>+/−</sup>)-Messung unterzogen. Dabei konnten in beiden Fällen weder Metabolite, Testsubstanz **13h** noch die Hydrolyseprodukte (HP-1 und HP-2) nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schliessen, dass die Abwesenheit von detektierbaren Metaboliten nicht auf deren Proteinbindung zurückzuführen ist.

Um tatsächlich ausschließen zu können, dass die Testsubstanz **13h** keiner im mikrosomalen System nachweisbaren Metabolisierung unterliegt (wie es z.B. in Literatur<sup>227</sup> für das Antidepressivum Milnacipran beschrieben wird, welches nicht oder nur vernachlässigbar über das CYP450-System metabolisiert wird), wurde mit der Herstellerfirma (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) der humanen Lebermikrosomen Kontakt aufgenommen. Laut Aussage dieser Firma ist für das Gelingen einer *in vitro*-Metabolisierungsstudie der Zeitpunkt der Zugabe vom Coenzym NADPH von entscheidender Bedeutung. Bei einem Vergleich des bisher verwendeten Inkubationssystems (Methode 1, s. Kap. 10.6.1) mit dem vom Thermo Fisher empfohlenen, fiel auf, dass der wesentliche Unterschied darin bestand, dass das Coenzym als letzte Komponente zu der bereits auf 37 °C temperierten Lösung (Mikrosomen + Testsubstanz) gegeben wurde. Der Grund für diese Vorgehensweise ist der Stabilität von NADPH geschuldet. Wu *et al.*<sup>228</sup> konnten belegen, dass die Stabilität von NADPH Temperatur- und pH-Wert-abhängig ist, wobei pH-Werte unterhalb von 7,4 und Temperaturen oberhalb von 30 °C zur erhöhten Instabilität führen.<sup>228</sup> Des Weiteren konnte von Wu *et al.* gezeigt werden, dass die Halbwertszeit von NADPH bei 19 °C etwa acht Std beträgt, während sie bei 41 °C auf eine Std reduziert wird. Zudem stellten sie fest, dass die Zerfallsrate von NADPH in Puffersystemen (pH-Wert 7,5), welche KCl enthielten, höher war als in jenen, die stattdessen NaCl enthielten.<sup>228</sup>

Aufgrund dieser Feststellung wurde die Inkubationszeit wieder auf eine Std herabgesetzt, der Puffer ausgetauscht (Kaliumphosphat -> PBS) und der Vorgehensweise von Thermo Fisher folgend (Methode 2, s. Kap. 10.6.2) die Metabolisierung wiederholt.

In weiterer Folge werden die für Methode 1 und 2 in Bezug auf die Phase I- Biotransformation erzielten Ergebnisse veranschaulicht. Die Kombination aus Phase I + II wurde ebenfalls mit beiden Methoden durchgeführt, jedoch zeigten sich auch hierbei weder Unterschiede zwischen den beiden Vorgehensweisen, noch konnten Metabolite nachgewiesen werden. Daher wurden der Übersichtlichkeit wegen die Ergebnisse nicht graphisch dargestellt.





**Abb. 6.21.** Untersuchung des Einflusses der zeitlichen Zugabe von NADPH zum Inkubationssystem (Methoden 1 und 2) auf die Biotransformation. (A) die Negativkontrolle stellt das Inkubationssystem ohne NADPH dar. (B) die Beendigung der Reaktionszeit direkt nach Zugabe von NADPH wird durch die "0 min"-Probe gezeigt. (C) Darstellung der Phase I-Metabolisierung bei einer Inkubationszeit von 60 min.

Negativkontrolle	Methode	RT [min]	Molekulargewicht	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup> gefunden	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup> berechnet	Summenformel	Peakfläche	Peakfläche[%] in Bezug auf die Testsubstanz
Testsubstanz	1	2,402	533,2274	534,2351	534,2347	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	11.712.330,95	100
Testsubstanz	2	2,401	533,2274	534,2348	534,2347	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	12.681.418,84	100
HP-1	1	2,213	551,2380	552,2456	552,2453	C <sub>28</sub> H <sub>33</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	510.996,19	4,36
HP-1	2	2,212	551,2380	552,2459	552,2453	C <sub>28</sub> H <sub>33</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	575.906,69	4,54
HP-2	1	2,729	518,2165	519,2238	519,2238	C <sub>28</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	183.434,71	1,57
HP-2	2	2,729	518,2165	519,2238	519,2238	C <sub>28</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	198.250,30	1,56
"0 min."- Probe								
Testsubstanz	1	2,401	533,2274	534,2350	534,2347	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	11.277.285,70	100
Testsubstanz	2	2,403	533,2274	534,2352	534,2347	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	12.425.913,86	100
HP-1	1	2,212	551,2380	552,2450	552,2453	C <sub>28</sub> H <sub>33</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	131.404,38	1,16
HP-1	2	2,215	551,2380	552,2450	552,2453	C <sub>28</sub> H <sub>33</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	156.203,74	1,26
HP-2	1	2,729	518,2165	519,2238	519,2238	C <sub>28</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	159.371,15	1,41
HP-2	2	2,725	518,2165	519,2238	519,2238	C <sub>28</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	176.967,15	1,42
"60 min."- Probe								
Testsubstanz	1	2,405	533,2274	534,2352	534,2347	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	11.174.791,96	100
Testsubstanz	2	2,400	533,2274	534,2349	534,2347	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	11.923.695,35	100
HP-1	1	2,211	551,2380	552,2456	552,2453	C <sub>28</sub> H <sub>33</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	466.245,10	4,17
HP-1	2	2,211	551,2380	552,2459	552,2453	C <sub>28</sub> H <sub>33</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	532.120,69	4,46
HP-2	1	2,727	518,2165	519,2238	519,2238	C <sub>28</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	193.329,32	1,73
HP-2	2	2,727	518,2165	519,2239	519,2238	C <sub>28</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	206.595,08	1,73

**Tab. 6.18.** MS (LC-MS, ESI<sup>+</sup>)-Ergebnisse zum Einfluss der zeitlichen Zugabe von NADPH zum Inkubationssystem (Methoden 1 und 2).

Während die Negativkontrolle (A) zur Prüfung der thermischen Stabilität der Testverbindung im Inkubationssystem dient, ermöglicht die "0 min"-Probe (B) eine Aussage darüber, ob ein Zerfall des NADPH erfolgt. Nach einer Reaktionszeit von 60 min (C) sollten dann - sofern die Testverbindung einem über CYP- oder FMO-vermittelten Metabolisierungsweg folgt - Metabolite der Phase I detektierbar sein. Metabolisierungen über andere Enzymsysteme konnten im Rahmen dieser Metabolisierungsstudie, aufgrund der Verwendung von HLMS, nicht erfasst werden (s. Kap. 6.1.8; **Tab. 6.10**).

In **Abb. 6.21** werden die Ergebnisse, die durch die jeweilige Methode (1 und 2) erhalten wurden, gegenübergestellt. Die in **Tab. 6.18** dargestellten Resultate veranschaulichen zum einen, dass der unterschiedliche Zeitpunkt der NADPH-Zugabe keinen Einfluss auf die Bildung von Metaboliten hat und zum anderen, dass zwischen den beiden Methoden kein wesentlicher Unterschied in den relativen Werten (Methode 1, (HP-1, 4,17 %; HP-2, 1,73 %) vs. Methode 2 (HP-1, 4,46 %; HP-2, 1,73 %)) zu finden ist. Damit lässt sich die Abwesenheit von Metaboliten nicht auf eine Instabilität des NADPH zurückführen.

Des Weiteren konnte aus diesem Experiment abgeleitet werden, dass die Bildung von Hydrolyseprodukten nicht durch NADPH-abhängige CYP-Aktivität bedingt ist (vgl. der

relativen Werte neg. Kontrolle vs. 60 min-Probe, **Tab. 6.18**), sondern eher von den Faktoren Temperatur und pH-Wert abhängt. Wie ein Vergleich der Negativkontrolle zur „0 min“-Probe (Beendigung der Enzymreaktion direkt nach Zugabe von NADPH) zeigt, sind bei längerer Inkubationszeit (60 min vs. 0 min) höhere relative Werte für beide Hydrolyseprodukte, besonders jedoch für HP-1 (neg. Kontrolle, (HP-1, 4,36 %) vs. 0 min, (HP-1, 1,16 %)) zu verzeichnen.

Nachdem die Entstehung der Hydrolyseprodukte in allen durchgeführten Experimenten stets reproduzierbar war, wurden die beiden Modifikationen (Kopfgruppe mit geöffnetem D-Ring sowie Vorliegen der Carbonsäure) an der Leitverbindung Marbostat-100 (**13a**) untersucht (s. Kap. 3.2). Marbostat-100 (**13a**) wurde zuerst untersucht, da beide Verbindungen (Testsubstanz **13h** und Marbostat-100, **13a**) vergleichbare  $K_i$ -Werte (**13a**, ( $K_i = 0,70$ ) vs. **13h** ( $K_i = 0,48$ )) s. Kap. 4.2.1, **Tab. 4.1**) aufweisen und die Leitverbindung **13a** durch intensive Struktur-Wirkungsbeziehung besser charakterisiert ist (s. Kap. 4.2.1 und Kap. 5.2). Wie in den Kap. 4.2.1 und Kap. 5.2.5 gezeigt, ist lediglich das Analogon von HP-1 **32** wirksam. Während die Öffnung des D-Ringes die inhibitorische Fähigkeit nicht beeinträchtigte, ist bei Abwesenheit der chelatisierenden Komponente (Hydroxamsäure) keine HDAC-Hemmung zu erkennen.

### 6.3.6 Einfluss von **13h** auf die Metabolisierung der Positivkontrolle 7-EC

Im Rahmen der *in vitro*-Metabolisierungsstudie konnten trotz zahlreicher Modifikationen am Aufbau des Inkubationssystems keine Metabolite von 7-EC im mikrosomalen Testmodell massenspektrometrisch erfasst werden, obwohl die chemische Struktur der Verbindung durchaus Angriffspunkte für Phase I-Enzyme bietet. Die Abwesenheit von Metaboliten könnte einerseits darin begründet sein, dass die Testsubstanz **13h** (s. **Abb. 6.20**) durchaus eine Biotransformation durchläuft, diese jedoch über „non-CYP“-Enzyme (s. Kap. 6.1.6) vermittelt und damit in dem betrachteten *in vitro*-Testmodell nicht erfasst wird. Andererseits wäre denkbar, dass die Verstoffwechselung nicht in der Leber, sondern in einem anderen Organ, z. B. in der Niere oder im Darm stattfindet und damit die HLMs ein ungeeignetes *in vitro*-Testmodell sind. Da ein Arzneistoff auch mit CYP-Enzymen interagieren kann, wenn diese nicht an seiner Metabolisierung beteiligt sind,<sup>227</sup> könnte eine weitere Erklärung in einer inhibitorischen Wirkung des HDACi auf die CYP-Aktivität zu finden sein. Wie aus den Kap. 6.1.2 und 6.1.5 hervorgeht, können Veränderungen der Genexpression von Arzneistoff-metabolisierenden Enzymen sich auf den biochemischen



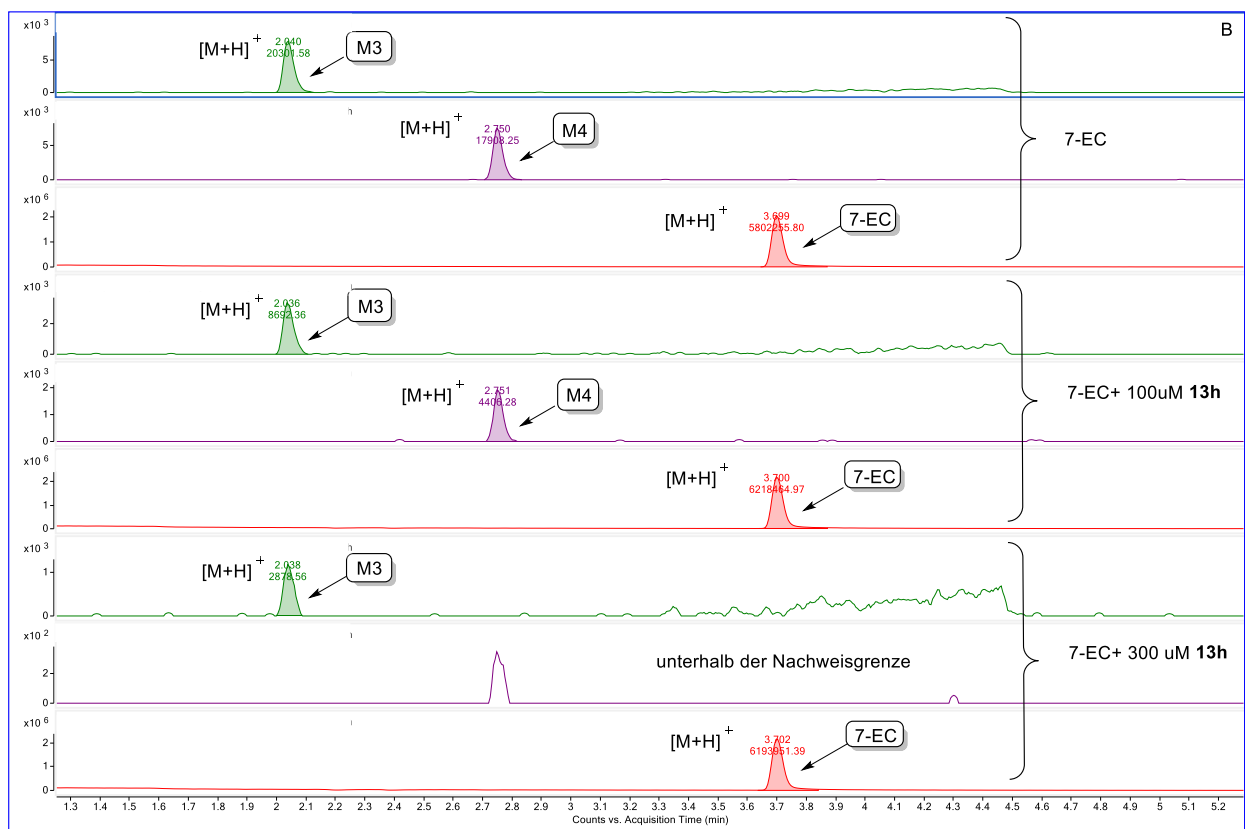
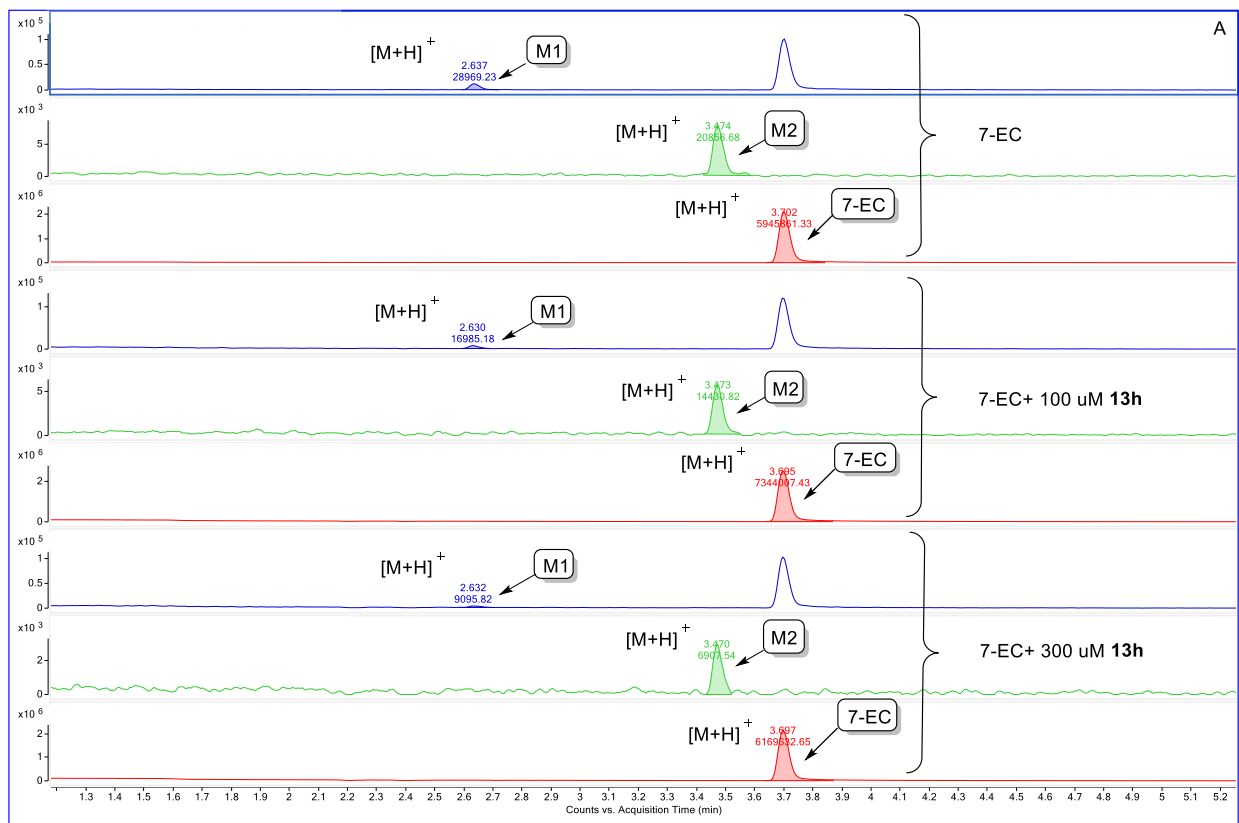
Prozess der Verstoffwechselung auswirken.<sup>209</sup> Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei der Testverbindung um einen HDACi handelt, wäre es denkbar, dass eine veränderte Genexpression bestimmter CYP-Isoformen zu einer Beeinträchtigung der Biotransformation führen kann.

Es sind Beispiele für Verbindungen aus der Klasse der HDACi bekannt, die die CYP-Aktivität beeinflussen: Hooven *et al.*<sup>229</sup> zeigten, dass Zellen, die mit SAHA (**1**) oder TSA (**2**) behandelt wurden, die Aktivität des CYP 1A1-Enzyms steigern, jedoch die Expression von CYP 1B1 unterdrücken. Bei Betrachtung des CYP 3A4-Enzyms, welches hauptsächlich für die Biotransformation vieler Arzneistoffe verantwortlich ist (s. Kap. 6.1.1; **Abb. 6.2**), konnte eine Aktivitätssteigerung gegenüber Valproinsäure (**5**) festgestellt werden, während Trichostatin A (**2**) keinen Effekt auf die Expression dieses Enzyms aufwies.<sup>230,231</sup>

Aufgrund dieser Erkenntnisse, sollte geklärt werden, ob das Fehlen nachweisbarer Metabolite in einer inhibitorischen Wirkung der Testsubstanz **13h** bezogen auf die CYP-Aktivität, begründet ist. Um dies zu verifizieren, wurde 7-EC, welches als Positivkontrolle im Rahmen der Metabolisierungsstudie diente sowie die Testverbindung in einem Inkubationssystem metabolisiert.

Der gemeinsamen Metabolisierung lag die Überlegung zugrunde, dass in dem gewählten Testmodell nur 7-EC zu bekannten Metaboliten transformiert wird, während bei der Testverbindung lediglich HP-1 und HP-2 hinzukommt. Diese Vorgehensweise ermöglichte es zu analysieren, ob sich die relativen Mengen der Metabolite von 7-EC durch die Zugabe von **13h** verändern. Die Wahl für die Referenzsubstanz fiel auf 7-EC, da einerseits von dieser Verbindung bekannt ist, welche CYP-Isoformen (CYP 1A2 und CYP 2E1)<sup>232</sup> an seiner Metabolisierung beteiligt sind und somit bei Vorliegen einer inhibitorischen Wirkung der Testsubstanz **13h** diese einer bestimmten CYP-Isoform zugeordnet werden kann. Andererseits wurden bereits im Rahmen dieser Arbeit geeignete Bedingungen für eine *in vitro*-Testung für 7-EC eruiert. Dieses Experiment wurde nach der für die Metabolisierung von 7-EC beschriebenen Vorschrift (Methode 1, s. Kap. 10.6.1) mit einer Reaktionszeit von drei Std durchgeführt. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Testungen gewährleisten zu können, erfolgten alle Reaktionen, die dieselbe Metabolisierungsphase (Phase I oder Phase I + II) untersuchten, an einem Tag, um gleiche Rahmenbedingungen gewährleisten zu können. Zunächst wurde die Stabilität der beiden in einem Inkubationssystem befindlichen

Verbindungen prüft, um ausschließen zu können, dass 7-EC mit der Testsubstanz **13h** interagiert und somit nicht mehr für Metabolisierungsreaktionen zur Verfügung steht. Die massenspektrometrische Suche nach Verbindungen, welche Produkte einer Interaktion zwischen 7-EC und der Testsubstanz **13h** sind, ergab keine Treffer. Somit wurde die Phase I-Metabolisierung zunächst mit der gleichen Konzentration (100 µM) an **13h** und 7-EC durchgeführt und anschließend mit einem dreifachen Überschuss an **13h** unter Beibehaltung der Konzentration an 7-EC (100 µM). Als Referenzchromatogramm diente in den betrachteten Phasen (I oder I + II) die Verstoffwechselung von 7-EC ohne Zugabe der Testsubstanz **13h**. Der Übersicht halber wird bei der Darstellung der Chromatogramme A und B der Fokus auf 7-EC sowie dessen Metabolite gelegt. Die in **Tab. 6.18** dargestellten Retentionszeiten von 7-EC weichen aufgrund des vorgenommenen Pufferwechsels (Kaliumphosphat -> PBS) von den in **Tab. 6.19** gezeigten ab.



**Abb. 6.22.** Konzentrationsabhängige Effekte von **13h** auf die relative Metabolitmenge von 7-EC. (A) Phase I-Metabolisierung. (B) Phase I + II-Metabolisierung.

<b>Phase I</b>	RT [min]	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup> gefunden	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup> berechnet	Summenformel	Peakfläche	Peakfläche [%] in Bezug auf 7- EC
7-EC	3,702	191,0711	191,0708	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	5.945.861,33	100
M1	2,637	163,0393	163,0395	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	28.969,23	0,49
M2	3,474	207,0650	207,0657	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	20.856,68	0,35
7-EC	3,695	191,0713	191,0708	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	7.344.007,43	100
M1	2,630	163,0393	163,0395	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	16.985,18	0,23
M2	3,473	207,0647	207,0657	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	14.430,82	0,20
7-EC	3,697	191,0709	191,0708	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	6.169.632,65	100
M1	2,632	161,0248*	161,0244*	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	9.095,82	0,15
M2	3,47	207,0648	207,0657	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	6.907,54	0,11

<b>Phase I+II</b>	RT [min]	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup> gefunden	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup> berechnet	Summenformel	Peakfläche	Peakfläche [%] in Bezug auf 7- EC
7-EC	3,699	191,0710	191,0708	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	5.802.255,80	100
M3	2,040	339,0714	339,0711	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	20.301,58	0,35
M4	2,750	383,0977	383,0973	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	17.908,25	0,31
7-EC	3,700	191,0710	191,0708	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	628.464,97	100
M3	2,036	339,0716	339,0711	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	8.692,36	0,14
M4	2,751	383,0982	383,0973	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	4.406,28	0,07
7-EC	3,702	191,0709	191,0708	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	6.193.951,39	100
M3	2,038	339,0709	339,0711	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	2.878,56	0,05
M4	/	/	/	/	/	/

**Tab. 6.19.** Auswirkung der Zugabe von **13h** auf die Peakflächen der 7-EC-Metabolite (Phase I und Phase I+II) anhand von MS (LC-MS, ESI<sup>+/−</sup>)-Messungen dargestellt. Dabei repräsentieren die Farben folgenden Sachverhalt: rot = 7-EC, grün = 7-EC+100 µM **13h** und blau = 7-EC+ 300 µM **13h**. \*: gefundene/ berechnete [M-H]<sup>−</sup>-Werte.

Wie **Abb. 6.22** zeigt, konnte bereits bei einem Vergleich der Phase I von 7-EC vs. 7-EC + 100 µM Testsubstanz **13h** (Chromatogramm A) eine Abnahme der relativen Werte (7-EC (M1, 0,49 %) vs. 7-EC + 100 µM Testsubstanz **13h** (M1, 0,23 %)) für die Metabolite des 7-EC beobachtet werden (s. **Tab. 6.19**). Lag **13h** im Überschuss vor, so findet man bei Betrachtung der relativen Werte eine weitere Reduktion um etwa 30 % (7-EC (M1, 0,49 %) vs. 7-EC + 300 µM Testsubstanz **13h** (M1, 0,11 %)). Da bei der MS-Messung kein interner Standard zugegeben wurde, ist dies allerdings nur ein grober Richtwert.

Auffällig ist, dass bei der Untersuchung von Phase I + II die Zugabe der Testsubstanz **13h** eine deutlich stärkere Auswirkung auf die Abnahme der relativen Werte von M3 und M4 zur Folge hat. Bei einem Überschuss der Testverbindung ist M3 nahezu nicht mehr vorhanden (0,05 %), und M4 lag bereits unterhalb der Nachweisgrenze, sodass die Peakfläche nicht mehr bestimmt werden konnte.

Die anhand der Chromatogramme A und B (s. **Abb. 6.22**) bzw. **Tab. 6.19** gemachten Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass die Testsubstanz **13h** die Aktivität der CYP-Isoformen CYP 1A2 und CYP 2E1 sowie die des Enzyms UGT beeinträchtigt. Um die Vermutung, dass es sich bei der Testverbindung um einen CYP- und / oder UGT-Inhibitor handelt, ausreichend belegen zu können, muss in weiteren Projekten - unter Verwendung der dazugehörigen Substrate - die Testverbindung gegen die einzelnen CYP-Isoformen getestet werden. Wie in Kap. 6.1.6.2 beschrieben, ist bereits für einige Arzneistoffe bekannt, dass sie beim Menschen die Glucuronidierung hemmen.

### 6.3.7 Zusammenfassung der Metabolisierungsstudie

Das Ziel der Metabolisierungsstudie war es, Metabolite zu identifizieren und nach erfolgreicher Identifikation zu synthetisieren sowie diese im Zellsystem hinsichtlich ihrer inhibitorischen HDAC6-Aktivität zu testen. Dadurch sollten erste Anhaltspunkte über das pharmakokinetische Profil erhalten werden, um abzuschätzen welche Vorkehrungen getroffen werden müssen, damit eine orale Applikation der Testsubstanz **13h** *in vivo* umsetzbar ist. Die erhaltenen Resultate zeigen, dass die Testverbindung im verwendeten *in vitro*-Modell weitestgehend stabil bleibt, da die beiden Hydrolyseprodukte, bezogen auf die Ausgangsverbindung, einen relativen Anteil von nur 5 % ausmachen. Viele HDACi, wie z.B. TSA (**2**), bleiben aufgrund mangelnder metabolischer Stabilität in den klinischen Studien und schaffen es nicht bis zur Zulassung.<sup>225</sup>

HLMs sind gut geeignet, um einen ersten Überblick über die Metabolite der Phase I sowie über die Glucuronidierungsreaktionen der Phase II zu erhalten. Nachdem in diesem *in vitro*-Modell keine Metabolite nachgewiesen werden konnten, sollte ein Testmodell gewählt werden, welches ein komplettes metabolisches Profil repräsentiert (s. Kap. 6.1.8). Damit ließe sich eruieren, ob die Abwesenheit von Metaboliten auf die mangelnde Enzymausstattung des verwendeten *in vitro*-Modells zurückzuführen ist, oder ob die Verstoffwechselung möglicherweise in einem anderen Organ stattfindet. In nachfolgenden

Projekten ist geplant, die im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Ergebnisse zur Metabolisierung von **13h** in Bezug auf eine potentiell inhibitorische CYP- und / oder UGT-Aktivität weiter zu verifizieren. Dabei soll unter anderem das Spektrum an Referenzsubstanzen erweitert werden.

## Kapitel 7

### Pharmakologischer Teil (IV von IV)



## 7 Rheumatoide Arthritis

### 7.1 Das Krankheitsbild

#### 7.1.1 Definition

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronische,<sup>233,234</sup> heterogene,<sup>233,235,236</sup> autoimmuninduzierte,<sup>233-235,237,238</sup> und symmetrische (beidseitig auftretende)<sup>233,239</sup> Gelenkentzündung der erosiven Form.<sup>233</sup> Zu den nicht-erosiven Formen gehören Erkrankungen wie Lupus erythematoses (SLE), idiopathische Polyarthritits (IPA) und die Arthrose.<sup>233</sup> Die erosive Form ist charakterisiert durch starke Schmerzen, bedingt durch Gelenkschwellung, Morgensteifigkeit der Gelenke<sup>240</sup> und Zerstörung der Synovialgelenke. Bei Synovialgelenken handelt es sich um einen Gelenktyp, der aus einer Gelenkpfanne sowie einer sensiblen Knorpelschicht besteht, welche die Gelenkflächen überzieht und dafür sorgt, dass die Knochen nicht aneinander reiben.<sup>235,241,242</sup> Die Schädigung ist hier hauptsächlich an der Synovialauskleidung im Bereich der kleinen diarthrodialen Gelenke der Hände und Füße zu finden.<sup>239,243-246</sup>

Die RA ist eine progressive<sup>242,247,248</sup> Krankheit und führt ohne Therapie zu funktionellen Bewegungseinschränkungen bis hin zur Arbeitsunfähigkeit.<sup>245</sup> Hervorgerufen wird dies durch eine irreversible Knochenerosion und Knorpelzerstörung.<sup>238,249,250</sup> Seit 1950 nimmt die Mortalitätsrate stetig zu und ist sowohl auf Begleiterkrankungen, wie Infektionen, Erkrankungen des Respirationsraumes, als auch auf schwere Verläufe der RA zurückzuführen.<sup>233,241,243</sup> Bezugnehmend auf eine in den Niederlanden durchgeführte Studie wird die Lebenserwartung für männliche Patienten mit RA um 7 Jahre reduziert, während die Reduktion bei Frauen bei 3 Jahren liegt.<sup>233</sup> Unter den chronisch-entzündlich rheumatischen Erkrankungen ist die RA zum einen die häufigste Art, (etwa 1 % der Weltbevölkerung aller ethnischen Gruppen ist betroffen<sup>233,238,244,250</sup>), und zum anderen jene mit der stärksten Gelenkzerstörung.<sup>240,246,251</sup> Das Risiko für die Manifestation einer RA-Erkrankung ist um das 2-3-fache höher für Frauen als für Männer und zeigt in beiden Geschlechtern eine altersabhängige Prävalenz.<sup>233,238,250</sup> Untersuchungen in den Jahren 1960-1962 der US National Health Examination ergaben zudem, dass die Wahrscheinlichkeit für Erwachsene unter 35 Jahren, an RA zu erkranken bei 0,3 % lag, während diese für Personen über 65 Jahren 10 % betrug.<sup>233</sup> In den meisten Fällen kann man sagen, dass der Erkrankungsgipfel im Alter von 40 Jahren liegt, wobei grundsätzlich jede Altersgruppe davon betroffen sein kann.<sup>250</sup>



### 7.1.2 Geschichtlicher Hintergrund

Rheumatische Erkrankungen wurden bereits von Hippokrates im 4. Jahrhundert v. Chr. erkannt und im 1. Jahrhundert n. Chr. wurde der Begriff „Rheuma“ das erste Mal als ein Schmerzfluss durch die Gelenke des Körpers definiert.<sup>233</sup> Im frühen 17. Jahrhundert konnte in Europa das Krankheitsbild teilweise beschrieben werden.<sup>246</sup> Die erste vollständige Beschreibung des klinischen Bildes der RA wurde 1800 Augustin Jacob Landré-Beauvais zugesprochen.<sup>233</sup> 1859 erfolgte dann von Sir Alfred Baring Garrod die Abgrenzung der RA zu Gicht (hervorgerufen durch Natriumurat-Kristalle in den Gelenken, Sehnen und Schleimbeuteln etc.) und rheumatischem Fieber (bedingt durch  $\beta$ -hämolytische Streptokokken).<sup>246,252</sup> Somit zählen rheumatische Erkrankungen zu den ältesten anerkannten Erkrankungen.<sup>233</sup>

Der Terminus „rheumatische Erkrankungen“ ist ein Sammelbegriff für mehr als 100 verschiedene Krankheitsbilder, wie rheumatoide Arthritis, Osteoarthritis, Lupus erythematoses, Osteoporose, Rückenschmerzen, Gicht etc..<sup>233</sup> 1987 wurden vom American College of Rheumatology (ACR) Kriterien, ausgearbeitet, die eine Klassifizierung der RA und damit eine Abgrenzung zu anderen rheumatischen Erkrankungen ermöglichen, ausgearbeitet.<sup>233,241</sup>

2010 wurden diese jedoch in einer Zusammenarbeit des ACR und EULAR (*European League Against Rheumatism*) überarbeitet.<sup>241</sup> Da der damalige Schwerpunkt auf der Abgrenzung zu anderen Krankheiten lag, hat man sich bei der Erstellung der Klassifizierung im Jahre 1987 an radiologischen Veränderungen orientiert, die jedoch erst im späteren Stadium sichtbar wurden.<sup>241</sup> Die Version von 2010 legt hingegen den Fokus darauf, eine Klassifizierung im frühen Stadium zu ermöglichen und somit den Vorteil einer frühzeitigen Therapie zu gewährleisten.<sup>241</sup>

### 7.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie sowie die Mechanismen, die zur Pathogenese der Erkrankung führen, sind bis heute nicht vollständig geklärt.<sup>233,234,237,238,248-250</sup> Einigkeit besteht hingegen darüber, dass es sich um ein multifaktorielles Geschehen handelt.<sup>250,253</sup> Einer der vielen Faktoren könnte eine genetische Prädisposition sein, die auf das humane Leukozytenantigen-System (oder MHC) zurückzuführen ist, genauer gesagt auf die dritte variable Region der Gene HLA-DRB 4 bzw. HLA-DRB 1.<sup>234,249,250</sup> Die HLA-DRB 1-Allele, die mit der Entstehung der RA in Verbindung

gebracht werden, da eine erhöhte Expression jener im Synovialgewebe von RA-Patienten gefunden werden konnte,<sup>234,250</sup> kodieren in ihrer variablen Region ein aus 5 Aminosäuren bestehendes Aminosäure-Motiv, welches als „shared epitope“ bezeichnet wird.<sup>246,250</sup> Mehr als 80 % der RA-Patienten tragen mindestens ein mit der Erkrankung assoziiertes HLA-DRB 1-Allel: DRB 1 \*0101, DRB 1 \*0401, DRB 1 \*0404, DRB 1 \*0405.<sup>234</sup> Der genetischen Prädisposition und dem erworbenen Immunsystem wird ein mögliches Zusammenspiel in der Pathogenese der RA zugesprochen, da zum einen autoreaktive T- und B-Zellen im arthritischen Gelenk gefunden wurden und zum anderen eine Aktivierung der T-Helfer-Lymphozyten, bedingt durch die Präsentation der Antigene über die HLA-Moleküle, denkbar ist. Dabei kann das Antigen exogener (virales oder bakterielles Protein) oder endogener Natur (citrullinierte Proteine) sein.<sup>234,249,252</sup> Inwieweit das adaptive Immunsystem jedoch für die Aufrechterhaltung der Erkrankung entscheidend ist, ist noch unklar, da beispielsweise Therapieansätze, die dieses als Target wählen (z.B. monoklonale Antikörper gegen T-Zellen) bisher keinen ausreichenden Effekt gezeigt haben.<sup>249</sup>

Zwischen dem angeborenen Immunsystem und den HLA-Genen bestehen ebenfalls Zusammenhänge, da beispielsweise das Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), welches eines der dominierenden Zytokine im Knorpel eines RA-Patienten ist, seinerseits eine gesteigerte Expression der HLA-Gene bewirkt.<sup>234</sup> Der Zusammenhang zwischen Trägern bestimmter Allele der HLA-DRB 1 Region und der Disposition für RA ist nicht in allen Populationen gegeben, sondern kann je nach geographischer Lage und ethnischer Bevölkerungsgruppe unterschiedlich sein.<sup>233,250</sup> Der Wahrscheinlichkeit, RA zu erben wird auf 60 % geschätzt,<sup>250</sup> wobei der genetische Beitrag der HLA-DRB 1-Gene bei ca. 30-50 % liegt und damit einen wichtigen genetischen Risikofaktor für die RA darstellt.<sup>250</sup>

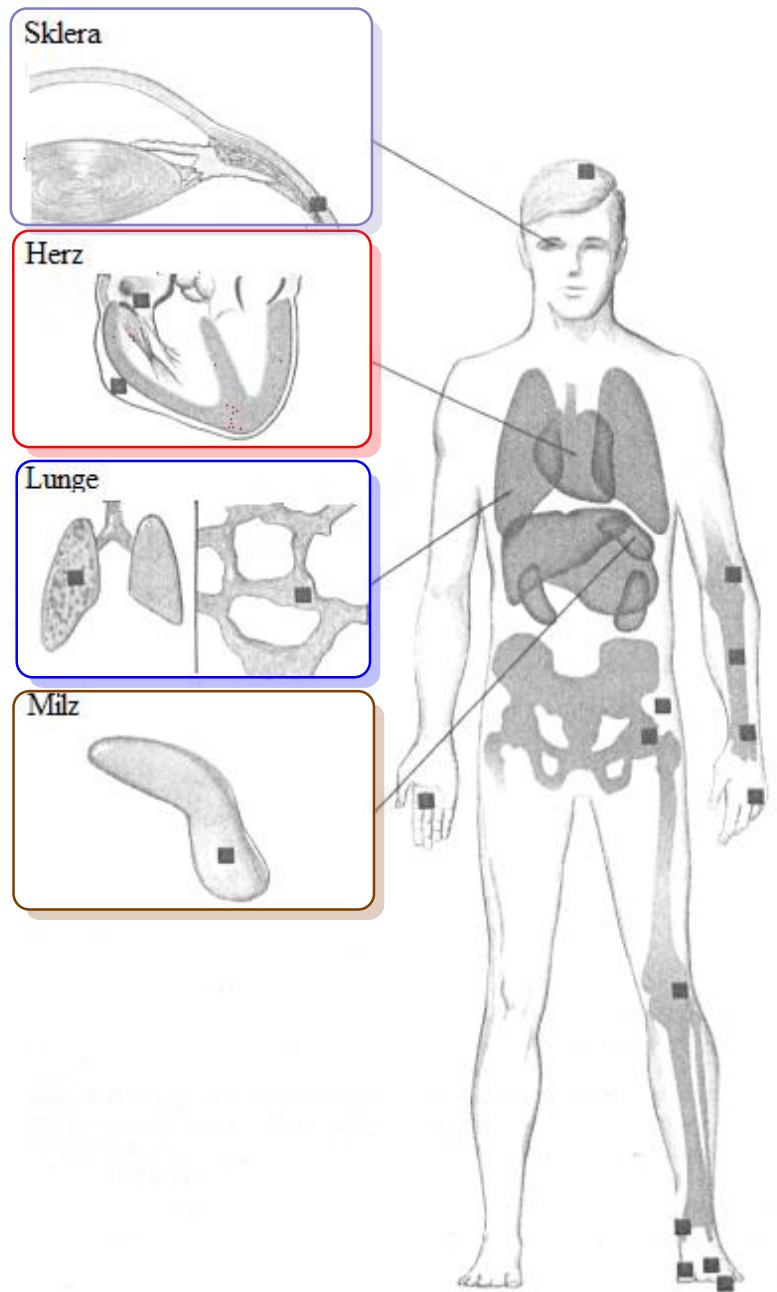
Aufgrund der noch nicht ausreichend erforschten Ursachen und weiterhin bestehenden belastenden Faktoren für die Betroffenen ist es essentiell, weitere Forschung in diesem Bereich zu betreiben.<sup>240</sup> Denn neben der finanziellen Last, welche diese Erkrankung mit sich bringen kann, ist auch der Verlust an Lebensqualität, bedingt durch die eingeschränkte Partizipation am Umfeldgeschehen, ein entscheidender Faktor.<sup>240</sup>

#### **7.1.4 Symptome**

Bei der RA handelt es sich um eine systemische Erkrankung,<sup>243</sup> deren Symptome in spezifische und nicht-spezifische gegliedert werden können. Nicht-spezifische systemische Anzeichen sind Müdigkeit, Abgeschlagenheit, leichtes Fieber, allgemeines Unwohlsein,<sup>254</sup> Gewichtsverlust und Depressionen.<sup>236</sup> Zu den spezifischen systemischen Zeichen zählen das arthritische Gelenk sowie die sogenannten rheumatischen Knoten, die histologisch durch einen von Lymphozyten umgebenen nekrotischen Kern gekennzeichnet sind.<sup>254</sup>

Aufgrund der Tatsache, dass im Rahmen dieser Arbeit der Fokus auf dem arthritischen Gelenk liegt, wird dieses ausführlich in einem gesonderten Kapitel (s. Kap. 7.2.1) beschrieben. Im Folgenden werden daher die rheumatischen Knoten näher charakterisiert.

Diese granulomatösen Gebilde wachsen im Laufe der Erkrankung und befallen besonders häufig Druckpunkte des Körpers, wie Ellenbogen und Streckflächen des Armes, weshalb besonders bei bettlägerigen Patienten die Schulterpartien betroffen sind.<sup>254</sup>



**Abb. 7.1.** Verteilung der rheumatischen Knoten im Körper des Menschen. Darstellung in Anlehnung an Lit..<sup>254</sup>

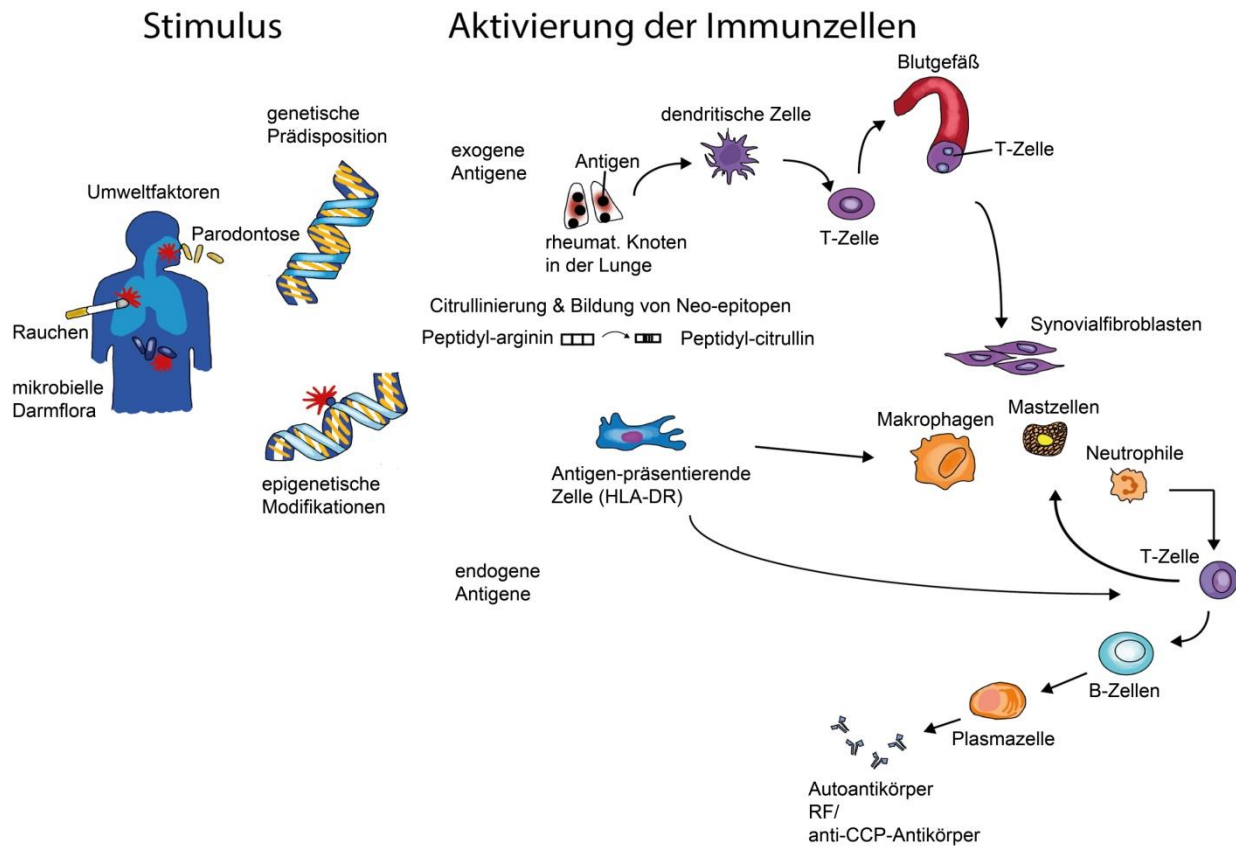
Weniger häufig findet man die Gebilde im Auge, wo sie unter anderem zur Entstehung eines akuten Glaukoms beitragen und letztlich sogar zur völligen Erblindung führen können.<sup>254</sup> Selten liegt ein Befall der Lunge sowie des Herzens vor.<sup>254</sup> Die Verteilung dieser rheumatischen Knoten zeigt **Abb. 7.1**. Bisher sind bereits zwei Syndrome, die nach ihren jeweiligen Entdeckern benannt wurden, bekannt, die durch eine Kombination aus RA und einem durch die Knoten befallenen Organ charakterisiert sind: Zum einen ist das Caplan-Syndrom zu nennen, bei dem zusätzlich zu den charakteristischen Symptomen der RA auch noch die Lunge befallen wird,<sup>254</sup> wohingegen das Felty-Syndrom eine Kombination aus RA,

Lymphknotenschwellung, Beinulzera und einer massiven Vergrößerung der Milz zeigt.<sup>254</sup> Neben den rheumatischen Knoten stellen Gelenk-bezogene Symptome ein wesentliches Charakteristikum der RA dar.

### **7.1.5 Prognostische Marker**

Das Vorhandensein von Autoantikörpern ließ Forschungsgruppen zu dem Schluss kommen, dass es bei der RA einen autoimmuninduzierten Hintergrund geben muss.<sup>241,253</sup> 1939 wurde schließlich einer der prognostischen Marker, der Rheumafaktor (RF) von Waaler entdeckt und von Rose im Jahre 1948 wiederentdeckt.<sup>246</sup> Dieser Faktor ist definiert als ein Antikörper gegen autologes Immunglobulin und ist, wie viele andere Antikörper, ebenfalls ein Immunglobulin. Genauer gesagt: Ein zur Familie der IgM-Autoantikörper gehörendes Immunglobulin<sup>246,252,254</sup>, welches gegen einen IgG-Antigen-Antikörper-Immunkomplex reagiert.<sup>252</sup> Welche Rolle diese Komplexe in der Stimulation und Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses spielen, ist immer noch nicht geklärt.<sup>254</sup> 1987 wurde er jedoch von der ACR als Merkmal für die Klassifizierung der RA aufgenommen,<sup>241</sup> da der RF nicht nur im Serum, sondern auch in der Synovialflüssigkeit und vor allem in der Synovialmembran von RA-Patienten gefunden werden konnte.<sup>254</sup> Rund 50-80 % der RF-serumpositiven Patienten, weisen eine besonders aggressive und zerstörende Form der Erkrankung auf.<sup>236,246</sup> Tests hinsichtlich der Sensitivität haben jedoch gezeigt, dass der RF nicht nur bei RA-Patienten gefunden wurde, sondern in geringen Mengen auch bei gesunden Individuen.<sup>246,252,254</sup> Daher liegt die Vermutung nahe, dass der rheumatoide Faktor bei RA-Patienten nicht der Auslöser ist, sondern vielmehr ein Ergebnis der bestehenden Erkrankung.<sup>254</sup> Autoantikörper gegen citrullinierte Peptide / Proteine (ACPA) sind im Vergleich zum RF hochspezifisch und haben den RF als prognostischen und diagnostischen Marker nahezu verdrängt.<sup>236,252</sup> Die Umwandlung der Aminosäure Arginin in Citrullin wird als Desaminierung bezeichnet und durch das Enzym Peptidylarginin De-iminase katalysiert.<sup>236,252</sup> Durch den Nachweis von Antikörpern gegen citrullinierte zyklische Peptide (CCP) konnte die Nachweissensitivität für RA auf 70 % gesteigert werden.<sup>236,241</sup> ACPAs sind in frühen Stadien der Erkrankung nachweisbar und sogar Jahre vor der Manifestation der RA detektierbar.<sup>241,252</sup> Das Vorliegen von ACPAs steht im engen Zusammenhang mit dem Vorhandensein eines „shared epitopes“.<sup>236,250</sup> Daher könnte der Nachweis des „shared epitopes“ als ergänzender prognostischer Marker neben den bereits bekannten (RF und ACPA) herangezogen werden.

## 7.2 Die rheumatoide Arthritis – ein multifaktorielles Geschehen



**Abb. 7.2.** Überblick über die Faktoren, die zur Aktivierung der Immunzellen führen in Anlehnung an Lit..<sup>255</sup>

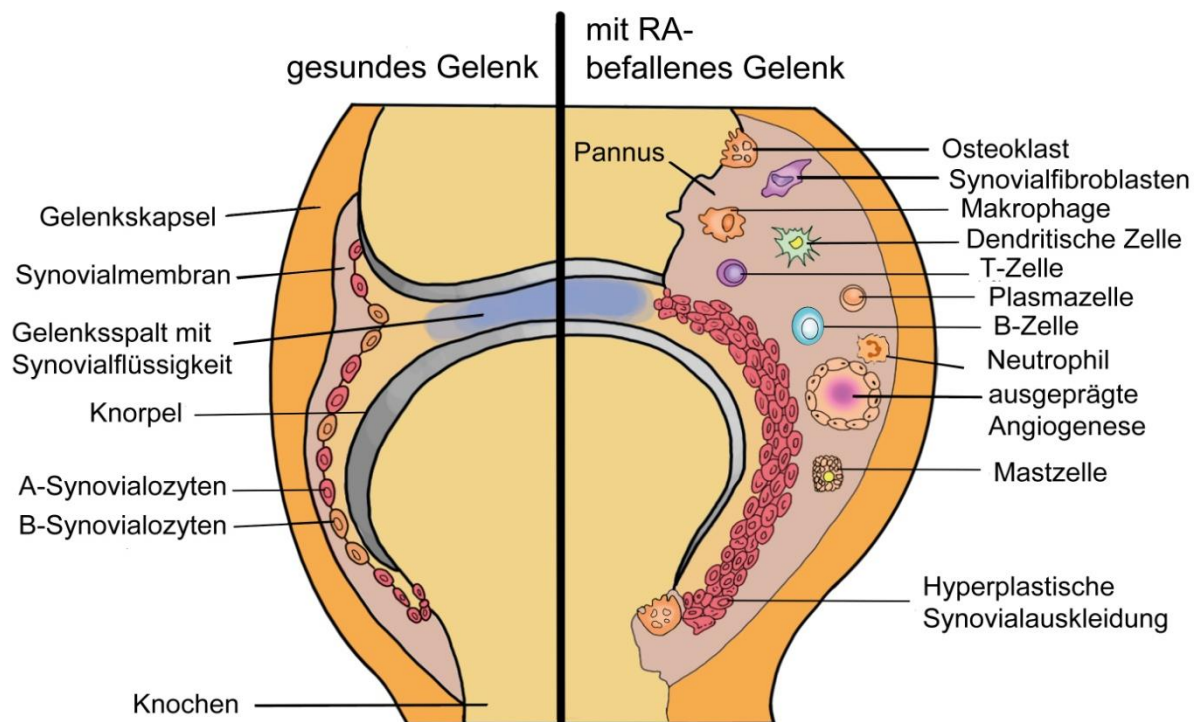
Wie schon in Kap. 7.2.2 erwähnt, tragen mehrere Faktoren zum Ausbruch, dem Fortschreiten und / oder der Chronifizierung der RA bei. Hierbei sind unterschiedliche umweltbedingte Einflüsse zu nennen,<sup>234,250,256</sup> wie beispielsweise die Inhalation von Tabakrauch.<sup>256</sup> Männer, die rauchen, entwickeln 2 mal häufiger und Frauen 1,3 mal häufiger RA als eine Nichtraucherkontrollgruppe.<sup>236</sup> Ein möglicher Grund dafür könnte auf einer Verknüpfung von Umweltbedingungen und genetischen Faktoren beruhen, da bei Rauchern das ACPA und die „shared epitopes“ nachgewiesen werden konnten.<sup>236</sup> Studien zur Immunpathogenese der RA haben des Weiteren gezeigt, dass Veränderungen in der Ernährung und Fettleibigkeit einen Einfluss haben können.<sup>236</sup> Ernährungsveränderungen können die Entzündungskaskade und Autoimmunität über eine veränderte Darmflora und den erniedrigten Eicosanoidspiegel beeinflussen.<sup>236</sup>

In den letzten Jahren ist die Bedeutung der mikrobiellen Flora des Darmes für das Immunsystem immer mehr in den Mittelpunkt der Forschung gerückt.<sup>256</sup> Aufgrund der Veränderungen im Bereich der mikrobiellen Darmflora, welche sich in einer gestörten

Metabolisierung und in Aktivitätsveränderungen des Immunsystems äußern, kann eine Verbindung zu Entzündungsprozessen im Rahmen der RA vermutet werden.<sup>256,257</sup> Bei der Untersuchung zum möglichen Einfluss von Fettleibigkeit auf die RA hat sich herausgestellt, dass diese allein nicht zum Ausbruch der Erkrankung führt, sich jedoch negativ auf das kardiovaskuläre System auswirken und damit einen zusätzlich belastenden Faktor für den RA-Patienten darstellen kann.<sup>236</sup> Neben der oben angeführten Darmflora könnte auch das Bakterium *Porphyromonas gingivalis* für weitere Einflussfaktoren verantwortlich sein.<sup>236</sup> Dieses Bakterium produziert das Enzym Peptidylargininde-iminase (PAD), welches seinerseits die Citrullinierung der Aminosäure Arginin bewirkt. Die Entstehung der Parodontose wird mit diesem Bakterium in Verbindung gebracht und könnte eine denkbare Verbindung zur RA sein, wobei immer noch nicht eindeutig geklärt ist, ob Pathogene entscheidend zur Entstehung der RA beitragen.<sup>236</sup>

Hormonelle Faktoren scheinen ebenfalls einen Beitrag zu leisten, da Frauen häufiger als Männer RA entwickeln (s. Kap. 7.1.1). *In vitro*-Studien dazu belegen, dass Androgene einen immunsuppressiven Effekt auf die Entzündung haben, wohingegen Östrogene die Aktivität der Immunzellen fördern.<sup>236</sup> Eine Mausstudie, bei der Dehydroepiandrosteron (DHEA) appliziert wurde, bestätigt dies ebenfalls, da der Ausbruch der Arthritis verzögert werden konnte.<sup>236</sup>

## 7.2.1 Das arthritische Gelenk



**Abb. 7.3.** Darstellung eines gesunden Gelenkes im Vergleich zu einem arthritischen Gelenk in Anlehnung an Lit.<sup>258</sup>

Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit wichtigsten Mediatoren, die zur Ausbildung eines arthritischen Gelenks führen, erläutert.

Das charakteristische Merkmal der RA ist die Ausbildung einer invasiven Gewebsform, des Pannus, der in weiterer Folge zu periartikulären Schädigungen führt (s. **Abb. 7.3**). Die Pannusbildung wird durch eine von der Norm abweichende fehlgesteuerte Angiogenese begünstigt, da die Migration von Leukozyten durch die Bildung neuer Blutkörperchen erhöht wird.<sup>236</sup> Neben der ausgeprägten Angiogenese, sind auch der Einstrom von Entzündungsmediatoren (T- und B-Zellen, Neutrophile, Makrophagen etc.) sowie die Hypertrophie der Synovialmembran ausschlaggebend dafür, dass sich die - normalerweise nur einige Zellschichten dicke - Membran zu einem ödematösen, roten und stark schmerzenden Gebilde entwickelt.<sup>236,239,254,259</sup> Die Synovialmembran besteht dabei aus Synovialozyten, welche ihrerseits in zwei Zelltypen (Synovialzellen) unterteilt werden können:<sup>254</sup> die



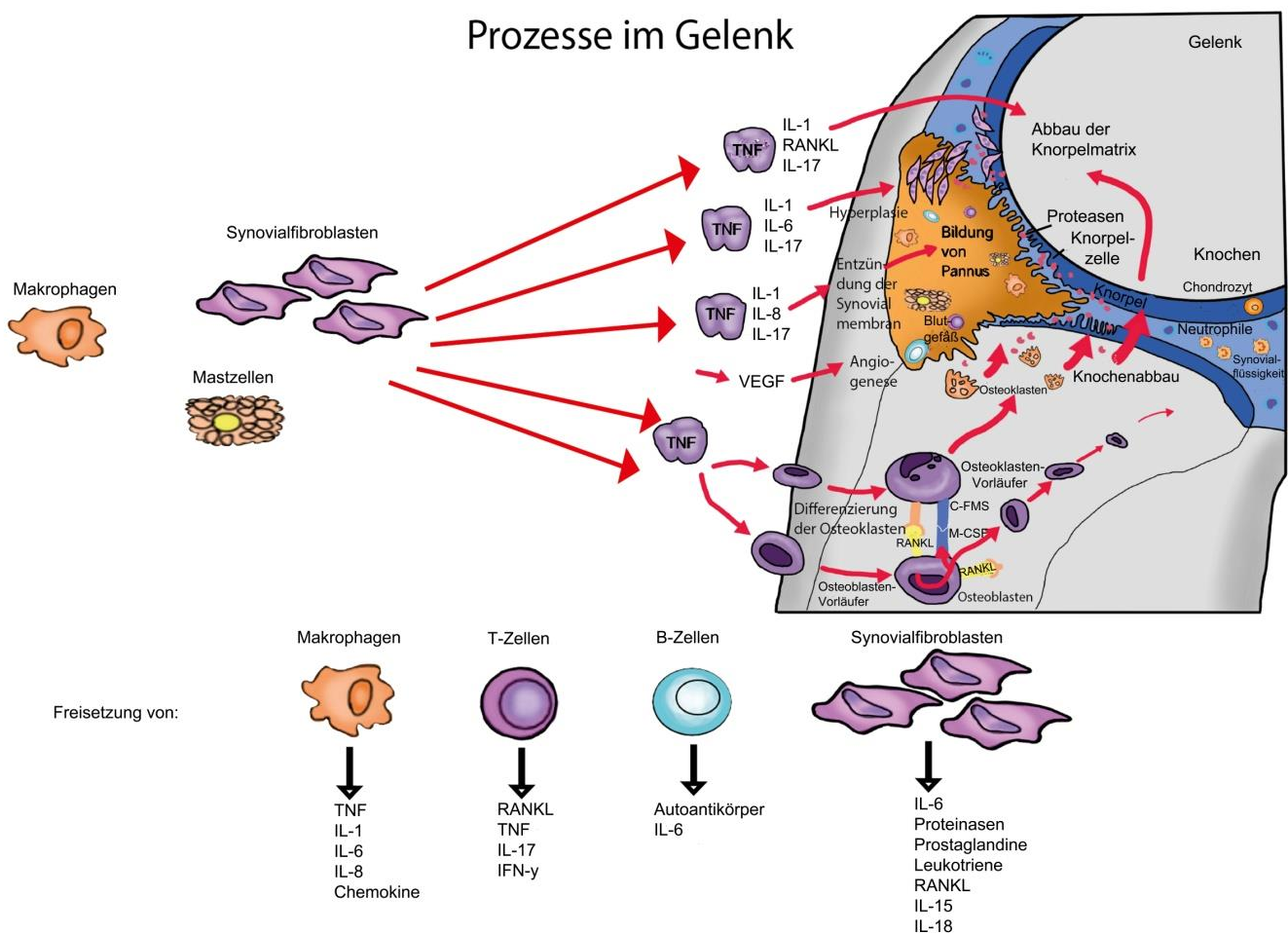
Typ A-Zellen (makrophagen-ähnliche Eigenschaften)<sup>236</sup> und die Typ B-Zellen (fibroblasten-ähnliche Synovialozyten (FLS)).<sup>260</sup> Zu den Aufgaben der Typ B-Zellen gehören auf der einen Seite die Sekretion der Synovialflüssigkeit und die damit einhergehende Produktion von Hyaluronsäure als wichtigsten Baustein. Des Weiteren sind sie für die Sekretion von Heparin, Proteoglykan und Kollagen als Bestandteile der extrazellulären Matrix sowie für die Bereitstellung von Nährstoffen verantwortlich.<sup>236,239</sup> Auf der anderen Seite ist die Phagozytose zu nennen, der man eine metabolische Funktion in Bezug auf die Bestandteile der Synovialflüssigkeit zuspricht.<sup>254,261</sup> Während man die Funktion der Phagozytose den Typ A-Zellen zuordnen kann, herrscht bei den anderen genannten Funktionen noch Unklarheit darüber, ob diese von den Typ A- oder Typ B-Zellen oder sogar von beiden gesteuert werden.<sup>254,261</sup> Die Typ B- (oder FLS)-Zellen nehmen insbesondere eine regulatorische Rolle im Zytokin-Netzwerk ein und gewährleisten damit einen dynamischen Umbau von Knochen- und Knorpelmasse.<sup>236</sup> Die Typ B-Synovialzellen machen in einer gesunden Synovialmembran 75 % aller Zellen aus.<sup>239</sup> Untersuchungen bezüglich der Zusammensetzung der Synovialflüssigkeit eines RA-Patienten haben gezeigt, dass es durch die vorliegenden Entzündungsprozesse zu einer erhöhten Proteinmenge kommt und damit eine selektive Aussortierung der Proteine, die in die Membran ein- und ausströmen sollen, nicht mehr gewährleistet werden kann.<sup>236</sup>

## **7.2.2 Pathogenese - mögliche Signalwege**

Erste Ergebnisse zur Ergründung der Pathogenese der RA wurden aus einem Experiment gewonnen, das heutzutage keine Genehmigung von der Ethikkommission erhalten würde,<sup>252</sup> jedoch zum Verständnis der Pathogenese einen großen Beitrag geleistet hat. Dieses Experiment hat gezeigt, dass Immunkomplexe die Basis der Entwicklung einer RA sein könnten.<sup>252</sup> Nach Entnahme gereinigter Immunglobuline G (IgGs) aus RA-Patienten sowie deren Rückinjektion ins serumpositive Gelenk, stellte sich heraus, dass dies zur Ausbildung einer akuten Arthritis führte. Diese Beobachtung konnte mithilfe der vorliegenden Antigene (IgGs) sowie der Antikörper (IgMs) erklärt werden.<sup>252</sup>

Im Gegenzug dazu löste die Injektion von IgGs, aus gesunden Spendern keine Arthritis aus, da hierbei lediglich Antikörper (IgMs) vorlagen.<sup>252</sup> Eine Injektion von IgG aus RA-Patienten in ein serumnegatives Gelenk konnte ebenfalls keine Arthritis induzieren, denn es war ausschließlich das Antigen (IgG) vorhanden.<sup>252</sup> Die aus diesem Experiment gewonnene Erkenntnis könnte damit eine Erklärung dafür sein, warum ein Komplex aus IgG-RF eine

Trotz schwer definierbarer Ätiologie geht man gegenwärtig davon aus, dass die Erkrankung zunächst durch eine Antigen-induzierte Aktivierung der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in Gang gesetzt wird, die ihrerseits die Immunantwort durch Stimulation von Monozyten, Makrophagen, B-Zelle, Synovialfibroblasten, Chondrozyten und Osteoklasten verstärkt (s. **Abb. 7.2**).<sup>243,247,262</sup> Ein entscheidendes Merkmal in der Entwicklung der Erkrankung ist die Ausbildung einer Synovialentzündung, die durch proinflammatorische Zytokine wie TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 hervorgerufen wird. Sie konnten in der Synovialflüssigkeit in hohen Mengen nachgewiesen werden.<sup>243,256,259,263</sup> Eine solche Entzündung wird von einer ausgeprägten Angiogenese, einer verstärkten Proliferation von Synovialfibroblasten sowie dem Einstrom weiterer proinflammatorischer Leukozyten begleitet.<sup>243</sup>(s. **Abb. 7.3**)



**Abb. 7.4.** Überblick über die Prozesse im Gelenk in Anlehnung an Lit..<sup>264</sup>

### 7.2.2.1 Phasen der pathologischen Veränderungen im Gelenk

Die pathologischen Veränderungen im Rahmen der RA lassen sich in drei Phasen unterteilen, wobei es keine scharfe Abgrenzung zwischen diesen gibt, sondern vielmehr einen fließenden Übergang.<sup>236,254</sup>

In der ersten Phase kommt es zur akuten Entzündung in der Synovialmembran des Gelenkes. Diese Entzündungskaskade ist nicht - wie bei vielen anderen entzündlichen Erkrankungen - selbst-limitierend, sondern sich selbst-aufrechterhaltend.<sup>254</sup> Über den genauen Auslöser dieser Kaskade wird spekuliert. Bisher wird lediglich ein Zusammenspiel aus genetischen Risikofaktoren, prädisponierenden Umweltfaktoren und der Präsenz autoreaktiver Antikörper vermutet (s. **Abb. 7.2**).<sup>244</sup>

Die zweite Phase ist durch die Pannusbildung (s. Kap. 7.3) und Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren sowie durch proteolytische Enzyme (Proteinasen) gekennzeichnet, welche zum Abbau der extrazellulären Matrix beitragen.<sup>243,247,254,263</sup>

Eine erhöhte Osteoklastenaktivität bei gleichzeitig gehemmter Osteoblastenaktivität führt dann zur Knochendestruktion (s. **Abb. 7.4**) und damit zur dritten Phase.

Wie in einer klinischen Studie gezeigt werden konnte, sind das Entzündungsgeschehen (Phase 1 + 2) und die Gelenkzerstörung jedoch nicht unmittelbar miteinander gekoppelt: Es konnte beobachtet werden, dass, trotz weiterhin bestehender Entzündung, das Fortschreiten der Gelenkzerstörung verzögert werden konnte.<sup>249</sup>

In dieser Arbeit wird eine Auswahl an Faktoren, die zur Pathogenese der RA beitragen, getroffen und näher beschrieben. Dabei wird der Schwerpunkt auf diejenigen gelegt, die im Rahmen dieser Arbeit am wichtigsten waren.

### **7.2.2.2 Rolle der T-Lymphozyten**

In den 1980er-Jahren wurde den T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle zugesprochen, da angenommen wurde, dass diese sowohl die Immunantwort als auch die Entzündungsmechanismen der RA-Erkrankung steuern.<sup>265</sup> In der heutigen Forschung wird die Rolle der T-Zellen in der Immunpathogenese der RA jedoch kontrovers diskutiert.

Bei T-Zellen kann aufgrund von spezifischen Markern auf der Oberfläche zwischen jenen, die sich im peripheren Blutsystem eines Menschen befinden, und jenen, die sich in der Synovialflüssigkeit bzw. im Synovialgewebe befinden, unterschieden werden.<sup>265</sup> Für ihren Beitrag zum Krankheitsbild der RA spricht, dass sich T-Zellen in der Synovialflüssigkeit und im Synovialgewebe im Überfluss befinden. Sie haben auch eine zu den HLA-DRB 1, da eine Assoziierung der RA mit den HLA-DRB-Genen eine Antigen-spezifische Antwort impliziert, wofür wiederum CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erforderlich sind.<sup>265</sup> Da die Menge an T-Zell-induzierten Zytokinen (IL-2, IFN  $\gamma$ ) im Gelenk niedriger ist, als jene die durch Makrophagen oder Synovialfibroblasten (IL-1, IL-6, IL-18) freigesetzt wird, ist dies eher ein Argument gegen eine dominierende Rolle der T-Zellen.<sup>246,265</sup>

### **7.2.2.3 Rolle der B-Zellen**

Die Tatsache, dass Therapien mit T-Zellen als Target keine ausreichende Wirkung bei allen RA-Patienten erbringen, lässt ihre Bedeutung in der Pathogenese ebenfalls bezweifeln.<sup>265</sup> Daher wurde nach weiteren Mediatoren gesucht und 1998 erstmals den B-Zellen eine Funktion in der Entzündungsentwicklung zugesprochen.<sup>253</sup> Dank neuerer molekularer Techniken konnten Autoantikörper, wie ACPA, entdeckt und die B-Zellen, als neue Target-Zellen, angesprochen werden.<sup>236</sup> Als Beispiel für einen monoklonalen Antikörper gegen B-Zellen ist Rituximab anzuführen, welches eine Wirksamkeit bei der Behandlung von RA-Patienten zeigt<sup>236</sup>

### **7.2.2.4 Rolle der RA-Fibroblasten-ähnliche-Synovialozyten (RASf)**

Während insbesondere die Synovialfibroblasten im gesunden Gelenk für die Homöostase verantwortlich sind, werden jene im arthritischen Gelenk epigenetisch zu RASf = RA-Fibroblasten-ähnlichen-Synovialozyten modifiziert. Sie verfallen in einen krebsähnlichen Zustand, in welchem sie ungehindert proliferieren und durch eine reduzierte apoptotische Aktivität (< 3 %)<sup>242</sup> gekennzeichnet sind.<sup>239,249,266</sup> Synovialfibroblasten setzen in weiterer

Folge Faktoren, wie Proteasen (Matrixmetalloproteinasen), proinflammatorische Zytokine (IL-15, IL-6, IL-8) und RANKL (*Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand*) frei, die die Struktur des Gelenkes schädigen und zu seinem Funktionsverlust beitragen. (s. **Abb. 7.4**).<sup>235,239,242,266</sup> RASF haben zudem einen Einfluss auf die RANKL-Expression über IL-1 $\beta$ , wobei an dieser Stelle festgehalten werden muss, dass RASF nur in Anwesenheit von proinflammatorischen Zytokinen RANKL produzieren können.<sup>239</sup> RANKL wird neben RASF auch von T-Zellen und Osteoblasten exprimiert<sup>246</sup> und führt durch Bindung an RANK (*Receptor Activator of NF- $\kappa$ B*) - ein Transmembranprotein, welches zur Familie der TNF $\alpha$ -Rezeptoren gehört - zur Osteoklastogenese.<sup>239,242,245,256</sup> Die Differenzierung der Osteoklastenvorstufe zur reifen Form wird nicht nur durch die Ausschüttung von RANKL und IL-15 induziert, sondern auch dadurch, dass die Synovialozyten, die auf der Knochenoberfläche sitzen, Parathyroidhormon, IL-1 und TNF $\alpha$  binden.<sup>245</sup>

Aufgrund der genannten Gründe scheinen RASF innerhalb der Vielzahl an beteiligten Zelltypen im Rahmen der RA eine wichtige Rolle einzunehmen, besonders bei der Chronifizierung der RA. Dafür sprechen Testungen auf zellulärer Ebene, die ergeben haben, dass RASF auch nach mehreren Zellpassagen ihre proinflammatorische Eigenschaft nicht verlieren.<sup>239</sup> Somit stellen sie ein interessantes Target für eine Behandlung dar, die auf eine Langzeitremission abzielt.<sup>249</sup> Sie sind nicht empfindlich gegenüber einer Apoptose, die durch TNF $\alpha$  induziert wird, sondern scheinen sogar durch TNF $\alpha$  eher zur Proliferation angeregt zu werden.<sup>249</sup> Eine Gabe von TNF $\alpha$  nach vorhergehender Inhibition von NF- $\kappa$ B bewirkt jedoch eine Apoptose.<sup>249</sup> Dies ist somit ein möglicher Angriffspunkt in der Therapie der RA.

#### **7.2.2.5 Rolle von TNF $\alpha$**

Nach Initiation des Entzündungsgeschehens findet man lokal im Gelenk-Mikromilieu eines RA-Patienten eine Vielzahl an Faktoren, die die Differenzierung und Aktivierung der Osteoklasten verstärken und regulatorische Mechanismen unterbinden (s. **Abb. 7.4**). Hierbei sind neben den bereits erwähnten Faktoren noch humorale Mediatoren, wie z. B. IL-1 $\beta$  und der Tumornekrosefaktor TNF $\alpha$  hervorzuheben. 1990 wurde diesen Mediatoren eine T-Zell-unabhängige Rolle in dem Mechanismus, der zur Entwicklung der Knorpel- und Knochendestruktion führt, zugesprochen.<sup>245,246</sup> TNF $\alpha$  wird hauptsächlich von Makrophagen produziert, während T-Zellen, Fibroblasten, Neutrophile und Lymphozyten nur wenig exprimieren.<sup>251,259</sup> Es gibt zahlreiche Hinweise dafür, dass TNF $\alpha$  eine dominierende Rolle in der Pathophysiologie der RA einnimmt: TNF $\alpha$  trägt zur Proliferation der Synovialfibroblasten

bei und hemmt die Proteoglykansynthese sowie die Osteoblastenaktivität (s. **Abb. 7.4**).<sup>239,251</sup> Da eine gesteigerte Expression in der Synovialmembran eines RA-Patienten vorliegt, wurde eine anti-TNF $\alpha$ -Gabe in vielen etablierten Tiermodellen zur RA untersucht und konnte in der Therapie zur Verbesserung des Krankheitsbildes beitragen.<sup>251</sup> Derzeit (Stand 2016) sind bereits 5 TNF $\alpha$  Therapeutika, Etanercept, Infliximab, Adalimumab, Golimumab und Certolizumab von der FDA (*Food and Drug Administration*) zur RA-Behandlung zugelassen.<sup>260</sup> TNF $\alpha$  übt einen Einfluss auf die Differenzierung der Osteoklasten aus, während das IL-1 $\beta$ , welches in Bezug auf die Knochendestruktion das potentere proinflammatorische Zytokin darstellt, eine duale Wirkung aufweist.<sup>245</sup> Einerseits stimuliert es Faktoren, die die Knochenmatrix zerstören und apoptotische Mechanismen verzögern, und andererseits hemmt es die Synthese von Proteoglykan und Kollagen Typ II.<sup>245,259</sup> Der Mechanismus, der hinter dem Effekt der anti-TNF $\alpha$ -Therapie steht, ist weiterhin nicht ganz geklärt, da auch in Abwesenheit von TNF $\alpha$  Osteoklastogenese und ein erosiver Verlauf der RA bestehen bleiben und somit TNF $\alpha$  nicht der alleinige Initiator sein kann.<sup>251</sup> Es liegt die Vermutung nahe, dass eine anti-TNF $\alpha$ -Therapie eher in den frühen Phasen der RA sinnvoll ist, da TNF $\alpha$  zur Induktion der Erkrankung beiträgt. Mit Progression der Krankheit kommen jedoch weitere Mediatoren hinzu, die mit einer TNF $\alpha$ -Therapie nicht ausreichend in den Griff zu bekommen sind. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum etwa 40 % der RA-Patienten auf eine anti-TNF $\alpha$ -Therapie nicht ansprechen.<sup>249,251</sup> Eine weitere interessante Beobachtung im Rahmen der TNF $\alpha$ -Therapie ist die Rückkehr der Erkrankung nach Beendigung der Therapie. Dies verdeutlicht, dass TNF $\alpha$  als Target die RA zwar unterdrückt, sie jedoch nicht heilt.<sup>246,249</sup>

#### 7.2.2.6 Rolle von OPG

Bei Betrachtung der RA unter den Gesichtspunkten der Knochenresorption und -bildung liegt ein Ungleichgewicht zwischen Osteoklasten- und Osteoblastenaktivität vor, welches zugunsten der Osteoklasten verschoben ist.<sup>245</sup> Marker, die das Vorliegen erhöhter Osteoklastenaktivität nachweisen, sind beispielsweise erhöhte Expressionen der Carboanhydrase und der H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase.<sup>245</sup> Beide sorgen für ein saures Milieu, welches zur Auflösung der Knochenminerale führt.<sup>239,245</sup> Ein weiterer Angriffspunkt zur Reduzierung der Osteoklastenaktivität ist die Blockade von RANKL mittels Osteoprotegerin (OPG), ein löslicher Rezeptor der TNF-Familie.<sup>245,251</sup> OPG wird von Osteoblasten freigesetzt, um die Bindung von RANKL an RANK zu verhindern, und nimmt damit eine regulierende Stellung in der Knochenhomöostase ein.<sup>239</sup> In einem entzündeten Gelenk wird durch die

eingewanderten T-Zellen das Verhältnis RANKL zu OPG erhöht und damit die Osteoklastenaktivitätsrate gesteigert.<sup>239</sup> Im Mausmodell unterdrückt OPG deutlich die Knochenzerstörung, jedoch bleibt eine Auswirkung auf das entzündliche Geschehen aus.<sup>245,246,251</sup>

Wie soeben beschrieben, ist das Zusammenspiel aus Osteoblasten und Osteoklasten wichtig für die Knochenbildung. Unter physiologischen Bedingungen werden 10 % der Knochenmasse jährlich umgebaut bzw. erneuert,<sup>239</sup> die Kapazität, die zerstörte Knorpelmatrix zu reparieren, ist jedoch deutlich limitiert.<sup>245</sup> Chondrozyten sind die einzigen Zelltypen, die für den Knorpelumbau verantwortlich sind, indem sie sowohl für die Synthese der extrazellulären Matrix sorgen, als auch Proteasen zur Verfügung stellen, die die beschädigte Matrix wieder abbauen.<sup>239,245,260</sup> Unter inflammatorischen Bedingungen wird das Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau zugunsten der Proteaseaktivität verschoben.<sup>239</sup>

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Initiation und Beständigkeit von RA durch eine komplexe Interaktion von Zellen des erworbenen Immunsystems, wie beispielsweise B- und T-Lymphozyten, und humoralen Mediatoren, wie die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  sowie den Makrophagen und RASF, gekennzeichnet ist (s. **Abb. 7.2**).<sup>267-269</sup> Hinzu kommen noch Antigen-präsentierende dendritische Zellen, die Antigene an Faktoren des angeborenen Immunsystems weiterleiten, die sich durch Risikofaktoren wie das Rauchen in der Lunge manifestiert haben. (s. **Abb. 7.2**).<sup>267-269</sup> Des Weiteren können auch Autoantikörper, wie ACPA einen Beitrag zur Pathogenese leisten, die an citrullinierte Proteine auf der Oberfläche von Osteoklasten-Vorläufern binden, die Expression von proinflammatorischen Zytokinen erhöhen und damit die Osteoklastogenese anregen (s. **Abb. 7.4**).<sup>239,260</sup> Aus all dem wird ersichtlich, warum es schwierig ist, das exakte Target für eine RA-Therapie zu finden.

### 7.3 Experimentelle Arthritismodelle

Experimentelle Tiermodelle sind eine gute Möglichkeit, multifaktorielle Erkrankung hinsichtlich Ursache, Krankheitsverlauf und Therapiemöglichkeiten zu studieren und bieten einen erheblichen Vorteil gegenüber humanen Materialien: Untersuchungen an Gelenken eines RA-Patienten, die nach operativen Eingriffen gewonnen werden, sind sowohl aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit schwierig. Darüber hinaus ist ein solches Gelenk aufgrund des fortgeschrittenen Krankheitsstadiums schon therapiert worden und daher ist es nahezu unmöglich ist, Rückschlüsse auf die auslösenden Faktoren zu ziehen.

Tiermodelle - bevorzugt Mäuse und Ratten - eignen sich hervorragend für RA-Studien, da bereits eine Vielzahl an Literaturdaten zu den Versuchsbedingungen existiert, genetische Homogenität vorliegt und die Zugänglichkeit auf eine statistisch aussagekräftige Tierzahl gegeben ist. Aufgrund der Heterogenität der Erkrankung<sup>233,235,236</sup> gibt es jedoch kein universelles Tiermodell für die RA. Je nachdem, wo der Schwerpunkt der Untersuchung liegt, kommen unterschiedliche Modelle in Frage, die eine Übertragung der Ergebnisse auf die humane Situation ermöglichen.<sup>270</sup> Aspekte der Reproduzierbarkeit und Versuchsdauer spielen ebenfalls eine Rolle bei der Entscheidungsfindung.<sup>270</sup> Man darf jedoch nicht außer Acht lassen, dass Tiermodelle grundsätzlich keine 100 %ige Darstellung der humanen Situation liefern: Die Erkrankung schreitet im Tiermodell schneller als beim Menschen fort und ist meistens charakterisiert durch eine akute Immunantwort, während beim Menschen mehrere Risikofaktoren als Auslöser der RA in Betracht kommen.<sup>270</sup> Zudem weisen Nagetiere eine sehr ausgeprägte Knochenresorption und -formation (besonders periostal und endostal) als Antwort auf eine Gelenkentzündung auf, die nicht bei allen RA-Patienten in dieser Form vorliegen muss.<sup>270</sup>

Im Folgenden wird auf die im Bereich der RA am häufigsten verwendeten Tiermodelle eingegangen und ihre jeweiligen Vor- und Nachteile erläutert. Abseits von diesen sind das Proteoglykan-Arthritis-Modell zu nennen, bei dem gegen den Knorpelbestandteil Proteoglykan immunisiert wird<sup>271</sup> sowie das gegen Glucose-6-phosphat-Isomerase (G6PI) gerichtete G6PI-Arthritis-Modell, bei dem es zur spontanen Entwicklung der Autoimmunerkrankung RA durch T-Zell-gesteuerte Antikörperbildung kommt.<sup>272</sup> Als Beispiele transgener Arthritiden sind das SCID (*severe combined immuno-deficiency*) sowie das TNF $\alpha$ -Mausmodell zu nennen. Durch das Fehlen funktionsfähiger T- und B-Zellen



eröffnet sich die Möglichkeit, Fragmente der entzündeten Synovialmembran oder RASF in das murine Kniegelenk zu transplantieren.<sup>238</sup> Die human / murine SCID-Arthritis eignet sich für Langzeituntersuchungen, da die Symptome bis zu 12 Wochen anhalten.<sup>238,242</sup>

1991 wurde von George Kollias ein transgenes Mausmodell mit einer Überexpression an humanem TNF $\alpha$  generiert.<sup>251</sup> Es ist von chronisch, progressiver Natur und unabhängig von Immunzellen, sodass es dazu verwendet werden kann, mehr über die Ätiologie zu erfahren, die nicht den Autoimmunaspekt involviert.<sup>251</sup>

Bei dem AIA (Adjuvans-induziertes Arthritis)-Modell handelt es sich um das erste Tiermodell, das für die RA in Ratten beschrieben wurde und besonders für Testungen zur Wirkung von NSAIDs und Glukokortikoiden verwendet wird.<sup>238,270</sup> Durch einmalige Injektion von CFA (komplettes Freund Adjuvans) in männliche Lewis-Ratten werden bereits nach 10 Tagen die ersten klinischen Anzeichen sichtbar.<sup>238,270</sup> Die auf diesem Wege ausgelöste Arthritis ist vom Komplementsystem und von T-Zellen abhängig, jedoch nicht von B-Zellen, und führt zu Symptomen, die der humanen RA ähnlich sind: Schwellung der Extremitäten, Knochenzerstörung, hohe Konzentrationen an Lymphozyten im Gelenk und dem daraus resultierenden Verlust der Gelenkfunktion.<sup>238</sup> Anders als bei der humanen RA und der CIA (Kollagen-induzierte Arthritis) ist die Knorpeldestruktion verhältnismäßig gering.<sup>238,270</sup> Der Vorteil dieses Modelles ist der, dass die Symptome länger als 1 Monat anhalten und somit Untersuchungen in verschiedenen Phasen der Erkrankung ermöglichen: Präklinische Phase (1-10. Tag), akute Phase (15-30. Tag), postakute Phase (30-50. Tag) und späte Phase (> 50. Tag).<sup>270,273</sup>

1996 wurde das K/BxN-Modell erstmals von Mathis und Benoist als ein für die RA geeignetes Modell beschrieben.<sup>274</sup> Hierbei werden zwei Mausstämme miteinander gekreuzt: Der KRN-Stamm und der NOD (*non obese diabetes*) – Stamm.<sup>274</sup> Der KRN-Stamm exprimiert einen transgenen T-Zellrezeptor, mit einer dualen Spezifität, der zum einen ein Peptid der bovinen Pankreasribonuklease (RNase) und zum anderen ein Epitop der Glucose-6-phosphat-Isomerase (G6PI) erkennt.<sup>244,274,275</sup> Der NOD-Stamm ist für die Expression des MHC II-Moleküls verantwortlich.<sup>244,274,275</sup> Somit ist die von diesem Modell ausgehende Entwicklung der Arthritis abhängig von CD4<sup>+</sup> T- und B-Zellen, die durch G6PI aktiviert werden.<sup>275</sup>

Das K/BxN-Modell weist eine nahezu 100 %ige Empfänglichkeit auf, da es mittels Serumtransfer auf andere Mäuse verschiedener Stämme (BALB/c, C57BL/6, DBA1, etc.) übertragen werden kann.<sup>274</sup> Das K/BxN-Modell ist zudem unabhängig von Immunstimulatoren, wie CFA, die das angeborene Immunsystem stimulieren.<sup>274,275</sup> Die in diesem Modell induzierte Arthritis weist eine gesteigerte Schmerzempfindlichkeit auf, die mit der Gelenkentzündung korreliert.<sup>244</sup>

Die Wahrnehmung des Schmerzes kann nicht nur während der bestehenden Gelenkentzündung untersucht werden, sondern auch noch 2-3 Wochen nach Abklingen der Entzündungsphase.<sup>244</sup> Daher eignet sich dieses Modell gut, um neue Mechanismen, die den Schmerz auslösen, zu ergründen.<sup>274</sup> Dieses Modell zeigt jedoch auch einige Nachteile bezüglich der Übertragbarkeit auf Menschen. Zum einen ist die schnelle Progression der Erkrankung zu nennen, welche zwar vorteilhaft ist, wenn es darum geht, in kurzer Zeit Ergebnisse zu erhalten, jedoch von Nachteil, wenn man ein - möglichst an die humane RA angelehntes - Modell haben möchte. Zum anderen muss man sich bei Verwendung dieses Modells bewusst sein, dass es nur die Effektorphase der humoralen Immunantwort nachahmen kann.<sup>274</sup>

Zwischen dem K/BxN-Modell und dem CAIA (Kollagen-Antikörper-induzierte Arthritis)-Modell bestehen einige Ähnlichkeiten, aber auch Unterschiede.<sup>274</sup> Beim zuletzt genannten Modell erfolgt die Immunisierung durch die Gabe von monoklonalen Antikörpern gegen Kollagen Typ II, wobei die Zugabe von LPS (Lipopolysaccharide) zum anti-Kollagen Typ II-Cocktail die Häufigkeit und Schwere der Erkrankung steigern kann.<sup>274</sup>

Beide Modelle repräsentieren die Effektorphase, können in verschiedenen Mausstämmen induziert werden, werden durch Antikörper ausgelöst, haben einen ähnlichen zeitlichen Krankheitsverlauf und initiieren das angeborene Immunsystem über Immunkomplexe.<sup>274</sup>

Wenn der Schwerpunkt der Forschung auf dem Zytokinnetzwerk liegt, so sollte beachtet werden, dass diese - je nach Tiermodell - unterschiedliche Rollen einnehmen: Während Neutrophile für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der RA in beiden Modellen (K/BxN und CAIA) entscheidend sind, ist das Zytokin TNF $\alpha$  für das CAIA-Modell von größerer Bedeutung als für das K/BxN-Modell.<sup>274</sup>

Der Hauptunterschied zwischen dem CAIA- und K/BxN-Modell ist in der Spezifität der Antikörper, die zur Ausbildung der Erkrankung führen, zu finden und in der damit einhergehenden unterschiedlichen Verteilung im Gelenk.<sup>274</sup> Bei der CAIA sind es Antikörper gegen Kollagen Typ II, während es beim K/BxN ein arthritogenes Serum ist, welches polyklonale Antikörper gegen G6PI enthält.<sup>274</sup> Beide Antikörper-Typen binden an der Knorpeloberfläche, jedoch ist das anti-G6PI-Serum, bei geringer Konzentration in der Induktion der Erkrankung effektiver, wohingegen bei der CAIA noch zusätzlich ein Adjuvans (z.B. LPS) hinzugegeben werden muss.<sup>274</sup> Der Weg, wie die Antikörper in das Gelenk gelangen, stellt einen weiteren Unterschied zwischen den beiden Modellen (CAIA & K/BxN) dar:<sup>274</sup> Die Immunkomplexe beim K/BxN-Modell zirkulieren im gesamten System, da G6PI ubiquitär im Körper ist, und aktivieren beispielsweise Neutrophile, die ihrerseits die Gefäßpermeabilität erhöhen und damit Antikörpern und Immunkomplexen den Eintritt ins Gelenk gewähren.<sup>274</sup> Beim CAIA-Modell ist Kollagen Typ II das Antigen, welches hauptsächlich im Gelenk zu finden ist. Somit werden systemisch keine Immunkomplexe geformt.<sup>274</sup> Dies bedeutet, dass durch eine systemische Gabe von anti-Kollagen Typ II ohne zusätzliche Gabe von LPS oder einer höheren Dosis an Antikörpern kein Eindringen ins Gelenk gewährleistet ist.<sup>274</sup>

Von den genannten Modellen bilden CAIA, AIA und CIA die Basis für die Mehrheit der Mausstudien zur Erforschung passender Therapieansätze, vor allem, wenn eine Antigenstimulation mit entzündlichen Signalwegen im Vordergrund steht.<sup>242</sup> Das CIA-Modell wurde zuerst in der Ratte etabliert und ist aufgrund seiner Ähnlichkeit zur humanen RA das am häufigsten verwendete Modell. Bei diesem wird zunächst eine chronische proliferative Synovitis ausgelöst, der im weiteren Entzündungsgeschehen eine Knochen- und Knorpeldestruktion folgt.<sup>237,238,274,276</sup> Daher eignet sich CIA besonders gut für die Untersuchung antiinflammatorischer und immunspezifischer Therapeutika.<sup>237</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurde das CIA-Mausmodell verwendet, obwohl der Krankheitsbeginn langsamer als bei der Ratte ist. Im vorliegenden Fall hat das Mausmodell den Vorteil, dass es eine Vielzahl an Protokollen gibt, um die Erkrankung auszulösen sowie eine Vielzahl immunologischer und genetischer Werkzeuge existieren um das Modell zu variieren.<sup>238</sup> Mäuse, die für dieses Modell verwendet werden, weisen eine bestimmte genetische Ausstattung auf. Das CIA-Modell ist daher auf einige wenige Mausstämme eingeschränkt.<sup>237,274</sup> Am häufigsten verwendet werden DBA/1-Mäuse.<sup>270</sup> Die Immunisierung erfolgt mit bovinem Kollagen Typ II, emulgiert mit CFA, da eine Immunisierung mit ICFA

(inkomplettes Freund Adjuvans) bei 67 % eine Erkrankung auslöst, während CFA eine Inzidenz von 100 % aufweist.<sup>237,274 270,277</sup> Es besteht die Möglichkeit, durch zusätzliche Gabe von LPS das Immunsystem der Maus stärker zu reizen und damit den Start der Erkrankung zu beschleunigen sowie einen einheitlichen Beginn mit allen Testmäusen zu erhalten.<sup>274</sup> 21-23 Tage nach der Immunisierung sind Vorder- und Hinterpfoten gerötet und geschwollen.<sup>270,276,277</sup> Die Schwellung tritt zu unterschiedlichen Zeiten in den jeweiligen Pfoten auf und geht stufenweise wieder zurück. Die histologische Schädigung bleibt bestehen.<sup>277</sup> Die Anzahl an betroffenen Pfoten variiert innerhalb der Tiere, meistens ist die erste Pfote stärker betroffen, und die restlichen drei folgen innerhalb der nächsten vier Wochen.<sup>277</sup> Bei diesem Modell ist sowohl ein prophylaktischer, als auch ein therapeutischer Behandlungsansatz nach dem Auftreten von Läsionen möglich.<sup>270</sup> Im Rahmen dieser Dissertation stand der therapeutische Ansatz im Vordergrund.

Das gewählte CIA-Modell weist einige Gemeinsamkeiten zur humanen RA auf. Aus klinischer Sicht ist das Auftreten von Ödemen zu nennen. Die histologische Sichtweise zeigt typische RA-Charakteristika, wie Synovitis, Pannusbildung, Knochen- und Knorpelerosion. Immunologisch wird, wie bei der humanen RA, RF gebildet.<sup>238</sup> Vergleicht man das CIA-Modell mit dem AIA, so lässt sich sagen, dass es bei dem CIA-Modell zu einer leichteren Form der Arthritis kommt.<sup>238</sup> Im Gegensatz dazu spielen jedoch bei diesem Modell die B-Zellen und das Komplementsystem eine Rolle.<sup>238</sup> Die Einbindung des Komplementsystems in die Arthritisentstehung ist dem CIA- und CAIA-Modell gemeinsam. Der Krankheitsbeginn liegt beim CAIA-Modell deutlich früher, und die Verwendung genetisch veränderter Mäuse ist gegeben.<sup>274</sup> Ein Vergleich zwischen dem CIA- und dem K/BxN-Modell zeigt, dass die beim CIA-Modell hervorgerufene Arthritis ein Ergebnis einer aktiven Immunisierung ist, während K/BxN durch passiven Antikörper-Transfer induziert wird.<sup>274</sup> Dadurch wird verständlich, dass T- und B-Zellen für das K/BxN-Modell entbehrlich sind, wohingegen beim CIA die T-Zellen wesentlich sind, da diese durch Kollagen Typ II angeregt werden und daraufhin B-Zellen zur Produktion von Antikörpern stimulieren.<sup>246,274</sup> Der Vorteil des K/BxN-Modells gegenüber dem CIA ist der, dass dieses in verschiedenen Mausstämmen induzierbar ist und einen zeitlich einheitlichen Krankheitsausbruch gewährleistet. Da die Latenzzeit recht kurz ist, liefert das K/BxN-Modell schnellere Ergebnisse, allerdings nur über die Effektorphase. Beim CIA hingegen wird sowohl die Effektor-, als auch die Aktivierungsphase repräsentiert.<sup>274</sup>

## 7.4 Diagnose und diagnostische Maßnahmen

In der frühen Phase der Erkrankung kann bei Patienten ein unbestimmter Schmerz mit gradueller Ausprägung auftreten, ohne dass die klassischen Symptome, wie Gelenkschwellung, Rötung und Druckempfindlichkeit vorliegen.<sup>278</sup> Die unspezifischen Symptome können lange anhalten.<sup>278</sup> Dieser schleichende Beginn trifft auf 75 % der Patienten zu.

Die Dauer der Morgensteifigkeit (> 30 min) in Verbindung mit Gelenkschmerz, die von der Norm abweichenden Laborwerte (erhöhte CRP (C-reaktives Protein)- und ESR (Erythrozytensedimentationsrate)-Werte)<sup>278</sup> sowie die Zahl der betroffenen Gelenke können als Hinweise auf eine rheumatische Erkrankung gedeutet werden.<sup>278</sup> Dabei kann die Zahl der Gelenke sowie der betroffene Gelenktyp von Patient zu Patient variieren.<sup>278</sup> Rheumatische Knoten sowie die Schwellung und Druckempfindlichkeit der kleinen Gelenke an Händen und Füßen sind weitere Symptome, die zu einer Diagnose der RA beitragen können.<sup>278</sup>

Die genannten Symptome bzw. Veränderungen im Blutbild sind jedoch nicht spezifisch für RA, wodurch eine Abgrenzung zu anderen Arthritisformen, wie Osteoarthritis, Psoriasis-Arthritis etc. schwierig ist.<sup>260,278</sup> Daher wird von den Rheumatologen zunächst eine undifferenzierte Arthritis diagnostiziert.<sup>260,278</sup> Diese vorläufige, nicht genau definierte Diagnose ermöglicht einen zeitnahen Beginn der DMARD-Therapie (*Disease-modifying anti-rheumatic drug*) (s. Kap. 7.5), da diese Medikamentengruppe für jede Art chronisch-inflammatorischer Arthritis geeignet ist.<sup>260</sup> Um schwere Formen der RA, die eine aggressivere Therapieform benötigen, zu verhindern ist eine frühzeitige Diagnose von essentieller Bedeutung.<sup>278</sup>

Die neuen ACR / EULAR-Klassifizierungskriterien (2010, s. Kap. 7.1.2) sind ein diagnostisches Instrument mit hoher Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu den ACR-Kriterien (1987, s. Kap. 7.1.2), da sie bildgebende Verfahren (z.B. Magnetresonanztomographie, Ultraschall) und Blutuntersuchungen (serologische Marker, wie RF und ACPA) einschließen.<sup>260,278</sup> Diese Klassifizierung ist jedoch nicht gleichzusetzen mit der Diagnose.<sup>260</sup> Während die Diagnose das Ziel verfolgt, den Erkrankungsgrad des individuellen Patienten richtig einzuordnen, ist der Fokus bei der Klassifizierung eine homogene Population für Forschungszwecke (*in vivo*-Studien) zu kategorisieren.<sup>260</sup> Die Kriterien der Klassifizierung können jedoch auch unterstützend zur Diagnose verwendet werden, da bisher noch keine spezifischen Tests für die detaillierte

Diagnose existieren.<sup>260,278</sup> Dabei ermöglichen es die vier Kategorien der ACR/ EULAR-Klassifizierung von 2010, die ersten Anzeichen der Erkrankung mittels Punkten näher zu charakterisieren:<sup>278</sup>

#### **Betroffene Gelenke**

0 Punkte	1 großes Gelenk (Schulter, Ellenbogen, Knie, Knöchel)
2 Punkte	1 bis 3 kleine Gelenke ( Finger, Zehen, etc.)
3 Punkte	4 bis 10 kleine Gelenke
5 Punkte	Mehr als 10 Gelenke

#### **Dauer der Symptome**

0 Punkte	Die Symptome dauern weniger als 6 Wochen an
1 Punkt	Die Symptome dauern 6 Wochen oder mehr an

#### **Blutbild**

0 Punkte	Negativer Befund für: ACPA und RF
2 Punkte	Mindestens einer der Werte ( ACPA oder RF)- ist am obersten Titer (> dreifacher Wert vom höchsten Wert)
3 Punkte	Mindestens einer der Werte ( ACPA oder RF)- ist am untersten Titer (< dreifacher Wert vom höchsten Wert, aber > der höchste Wert)

#### **Akut-Phasen-Proteine**

0 Punkte	Normale Werte für CRP oder ESR
1 Punkt	Von der Norm abweichende CRP- oder ESR-Werte

**Tab. 7.1.** Darstellung der vier Kategorien der ACR / EULAR-Klassifizierung von 2010 in Anlehnung an Lit..<sup>278</sup>

Ab einer Gesamtpunktzahl von 6 wird zumindestens laut den ACR / EULAR-Klassifizierungskriterien von einer RA gesprochen, sofern der Patient ein betroffenes Gelenk aufweist, welches im klinischen Sinne als Synovitis charakterisiert werden kann.<sup>278</sup> Diese Schlussfolgerung zur Diagnose sollte jedoch aus bereits genannten Gründen kritisch hinterfragt werden.

## 7.5 Therapie

Nach dem derzeitigen Stand der Forschung gibt es keine heilende Therapie.<sup>243</sup> Daher steht im Vordergrund der RA-Therapie das Erlangen eines dauerhaften Remissionszustandes, in dem der Schmerz und die Entzündungen kontrolliert sind, die Gelenkdestruktion so gering wie möglich gehalten sowie eine progrediente Verbesserung der körperlichen Funktionsfähigkeit gewährleistet wird.<sup>233,240,260,279</sup> Eine dauerhafte Remission ist jedoch meist schwierig oder kann nur durch ständige Medikation aufrecht erhalten werden, wobei im Laufe der Zeit, die Ansprechbarkeit auf die Therapie bei vielen Patienten abnimmt.<sup>260</sup> Ein früher Beginn der Therapie, der eine Diagnose im frühen Stadium voraussetzt, ist entscheidend, um eine klinische Manifestation der Erkrankung zu verhindern und einem operativen Eingriff als letztes Mittel entgegenwirken zu können. Allerdings ist eine Frühdiagnose bis heute eine enorme Herausforderung.<sup>260</sup> Im Folgenden soll auf die verschiedenen Therapieformen eingegangen werden, wobei physiotherapeutische Maßnahmen nicht berücksichtigt werden. Die aktuellen medikamentösen Therapiemöglichkeiten umfassen nichtsteroidale Antirheumatika (NSAIDs), Glukokortikoide und DMARDs.<sup>243</sup>

NSAIDs greifen nur in einen kleinen Bereich der Entzündungskaskade ein, der über Cyclooxygenasen (COX) gesteuert wird.<sup>280</sup> Immun-inflammatorische Kaskaden werden hier nicht therapiert. Auch auf die Gelenkdestruktion haben NSAIDs keinen Einfluss.<sup>233,270,280</sup> COX 1 hemmt über den Arachidonsäurestoffwechsel die Synthese von Prostaglandinen. So wird einerseits ein anti-inflammatorischer Effekt erreicht und andererseits die physiologische Wirkung von Prostaglandinen (wie z.B. die Magenschleimhautproduktion) gehemmt. Dies hat zur Folge, dass Erkrankungen wie Ulcera und Magenperforation auftreten (jährlich 0,3 - 2,5 % schwerwiegende gastrointestinale Beschwerden), die mit der Gabe von NSAIDs assoziiert werden. Daher sollte die Gabe auf einen kurzen Zeitraum begrenzt werden.<sup>281</sup>

Neben den nichtselektiven NSAIDs wie Diclofenac und Ibuprofen wäre auch der Einsatz von COX-2-Hemmern denkbar, die eine bessere Magenverträglichkeit aufweisen, jedoch aufgrund ihres erhöhten kardiovaskulären Risikos (Rückruf von Rofecoxib 2004 und Valdecoxib 2005) nicht verwendet werden.<sup>243</sup>

DMARDs bilden eine heterogene Gruppe, die sich in konventionell-synthetische, Target-synthetische und biologische DMARDs unterteilt.<sup>243,280</sup> Konventionell-synthetische DMARDs werden für die Langzeitanwendung genutzt, da sie das Entzündungsgeschehen

dämpfen.<sup>279</sup> Hierzu gehören Methotrexat (MTX), Goldsalze, Sulfasalazin, Leflunomid und Hydroxychloroquin.<sup>260</sup> Seit den 1920er Jahren sind die konventionell-synthetischen DMARDs im Gebrauch, wobei den Anfang die Goldsalze gemacht haben, die heutzutage kaum noch genutzt werden.<sup>280</sup> Die Verwendung von MTX hat sich mittlerweile als Goldstandard etabliert, wobei - vor allem in höheren Dosen - eine zusätzliche Applikation von Folsäure erforderlich ist.<sup>237,241,243,279,280</sup> Es konnte jedoch noch nicht endgültig gezeigt werden, dass MTX gegenüber anderen konventionell-synthetischen DMARDs überlegen ist.<sup>260</sup> In den 1990er Jahren folgte dann Leflunomid.<sup>280</sup> Hierbei handelt es sich um ein Prodrug, dessen aktiver Metabolit Teriflunomid das Enzym Dihydro-orotat-dehydrogenase hemmt, welches in die Pyrimidinsynthese eingreift.<sup>280</sup> MTX ist ein Folsäure-Antagonist und hemmt reversibel das Enzym Dihydrofolatreduktase, wodurch es nicht mehr zu einer Umwandlung von Dihydrofolsäure in Tetrahydrofolsäure kommen kann. Da die Tetrahydrofolsäure in der Purin- und Pyrimidinsynthese eine große Rolle spielt, hat eine Therapie mit MTX auch eine Auswirkung auf die De-novo-Synthese von RNA und DNA. Zudem konnte gezeigt werden, dass MTX die Expression von RANKL in Synovialfibroblasten reduziert und damit einen direkten Einfluss auf die Osteoklastenaktivität ausüben könnte.<sup>279</sup>

Zu den Target-synthetischen DMARDs gehört der Janus-Kinase-Inhibitor (JAK-Inhibitor) Tofacitinib.<sup>260</sup> Er ist der erste zugelassene pan-JAK-Inhibitor in den USA. Sein Gebrauch in der Europäischen Union war lange nicht genehmigt, er wurde erst am 27.3.2017 von der EMA (*European Medicines Agency*) zugelassen.<sup>260</sup> Transgene Mäuse, die TNF $\alpha$  überexprimieren, entwickeln eine starke Form der Arthritis. Das führte zu der Annahme, dass TNF $\alpha$  eine Schlüsselrolle in der Pathogenese (s. **Abb. 7.4**) der RA spielen könnte, woraufhin der Gebrauch von TNF $\alpha$ -Inhibitoren aktuell wurde.<sup>280</sup> Der Einsatz von TNF $\alpha$ -Inhibitoren in der RA-Therapie erzielte einen Durchbruch in den letzten 10 Jahren. Es darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass mehr als die Hälfte der Patienten bisher noch nicht ausreichend darauf ansprechen, eine Remission der Erkrankung wenn auch selten vorkommt und zudem diese Arzneistoffe erhebliche Nebenwirkungen aufweisen.<sup>246,280</sup>

TNF $\alpha$ -Inhibitoren wie Infliximab (nur i.v.-Gabe möglich), Etanercept, Adalimumab, Golimumab und Certolizumab (subkutane Applikation) gehören zu den biologischen DMARDs.<sup>260</sup>

Etanercept ist ein TNF $\alpha$ -Rezeptorkonstrukt, eine Kombination aus dem TNF $\alpha$ -Rezeptor und der Untereinheit des IgG-Antikörpers, während die anderen biologischen DMARDs



monoklonale Antikörper oder Fragmente von monoklonalen Antikörpern (Certolizumab) sind.<sup>260</sup> Da TNF $\alpha$  eine wesentliche Rolle in der Bildung protektiver Granulome spielt, führt Etanercept als TNF $\alpha$ -Rezeptorkonstrukt zu einer geringeren Granulomzerstörung. Damit ist das Risiko zur Entwicklung einer Tuberkulose niedriger als bei den anderen monoklonalen Antikörpern.<sup>260</sup>

Rituximab - ein gegen B-Zellen-gerichteter Antikörper (anti-CD20) - gehört ebenfalls zu den biologischen DMARDs, und ist bei der RA-Behandlung in der frühen Phase sehr effektiv. Er wird häufig als erstes biologisches DMARD genommen, wenn andere Arzneistoffe kontraindiziert sind (z.B. bei multipler Sklerose).<sup>260</sup>

Seitdem bekannt ist, dass Zytokine im inflammatorischen Prozess der RA eine Rolle spielen, ist das Interesse an spezifischen Therapeutika, die Zytokine als Target haben, gewachsen, wobei ihre parenterale Applikation sowie die Anfälligkeit der Patienten gegenüber Infektionen sich als nachteilig herausgestellt haben.<sup>280,282</sup> Hier sind das Tocilizumab, ein IL-6-Rezeptorantagonist, und der IL-1-Rezeptorantagonist Anakinra zu nennen.<sup>235,245,260</sup> Kombinationen aus biologischen DMARDs und MTX zeigen häufig bessere klinische Ergebnisse als die jeweiligen Monotherapien.<sup>283</sup> Wenn eine Monotherapie der biologischen DMARDs erforderlich wird, da z.B. eine Intoleranz gegenüber konventionell-synthetischen DMARDs vorliegt, ist Tocilizumab das Mittel der Wahl, da es effizienter ist als eine TNF $\alpha$ -Inhibitor-Monotherapie.<sup>260</sup>

Biologische und Target-synthetische DMARDs rufen mehr Nebenwirkungen hervor als die konventionell-synthetischen, da häufiger ernstzunehmende Infektionen auftreten. Deshalb ist insbesondere bei immungeschwächten Personen Vorsicht geboten.<sup>260</sup> So sollten biologische DMARDs - mit Ausnahme von Rituximab - bei Patienten, die an Hepatitis C erkrankt sind, erst 5 Jahre nach deren Heilung eingesetzt werden, um möglichen Risiken vorzubeugen.<sup>260</sup> Der schnellen und gezielten Wirkung biologischer DMARDs stehen jedoch hohe Kosten gegenüber sowie das Fehlen von Langzeitstudien, die eine Langzeit-Anwendung einschränken.<sup>283</sup>

Der Vorteil der DMARDs gegenüber NSAIDs liegt darin, dass sie das Immunsystem in seiner spezifischen Funktion unterdrücken, damit den Fortschritt der Erkrankung verlangsamen, und das Fortschreiten destruktiver Prozesse im Rahmen der RA behindern.<sup>280</sup> Jedoch muss beachtet werden, dass die Wirkung einiger Substanzen erst nach einigen Wochen (z.B. MTX)

oder sogar Monaten (z.B. Goldsalze) einsetzt.<sup>280</sup> Demnach ist der Einsatz von DMARDs nur dann sinnvoll, wenn die Therapie frühzeitig (innerhalb von 3 Monaten nach Diagnose) erfolgt.<sup>280,283</sup> Die Krankheitsaktivität kann allerdings nur bei 20-25 % der RA-Patienten in einen Ruhezustand (Remission) gebracht werden.<sup>280</sup> Trotz alledem ist die Fortsetzung einer DMARD-Therapie gerechtfertigt, denn der Abbruch würde das Risiko für neue Krankheitsschübe fördern.<sup>280</sup> Laut EULAR-Empfehlung sollten zur Beginn der Therapie konventionell-synthetische DMARDs - idealerweise MTX - zusammen mit Glukokortikoiden eingesetzt werden, um die Wirkungslatenzzeit der DMARDs zu überbrücken.<sup>260</sup> Eine kurze Anwendung moderater bis hoher Dosen von Glukokortikoiden kann gerade in der frühen Phase der RA hilfreich sein, um die Entzündung schnell unter Kontrolle zu bringen.<sup>279</sup> Ein weiterer Pluspunkt des Einsatzes von Glukokortikoiden ist die Verringerung der Matrix-abbauenden-Enzyme (Matrix-Metalloproteasen, MMPs).<sup>279</sup> Glukokortikoide eignen sich als potente antiinflammatorische Therapeutika und können zur Minimierung der Nebenwirkungen direkt ins Gelenk injiziert werden, allerdings darf dies nicht häufiger als alle 3 Monate einmal pro demselben Gelenk erfolgen.<sup>243</sup> Seit den 1950er Jahren werden Glukokortikoide bei der Behandlung von RA eingesetzt, jedoch zeigt sich bei Abwägung von Nutzen und Risiko, dass ein längerfristiger Gebrauch (1 Jahr oder länger) in höheren Dosen sowohl aufgrund des erhöhten Risikos von Nebenwirkungen als auch im Vergleich mit dem niedrigeren Nutzen als andere Therapeutika, nicht gerechtfertigt ist.<sup>284</sup>

Trotz der Verbesserungen, die in den letzten 20 Jahren im Bereich der Therapeutika für die RA gemacht wurden, ist die Erkrankung bis zum heutigen Tag nicht heilbar und eine ausreichende Retardierung der Erkrankungsprogression ist bei einer Vielzahl von Patienten weiterhin nicht möglich.<sup>280</sup> Die zunehmenden Kosten, die mit der Entwicklung von rekombinanten Proteinen verbunden sind, sowie die chronische Natur dieser Erkrankung stellen eine finanzielle Belastung sowohl für den Patienten, als auch für das soziale Umfeld dar.<sup>280</sup>

## 7.6 HDAC-Inhibitoren - eine neue Möglichkeit der RA-Therapie?

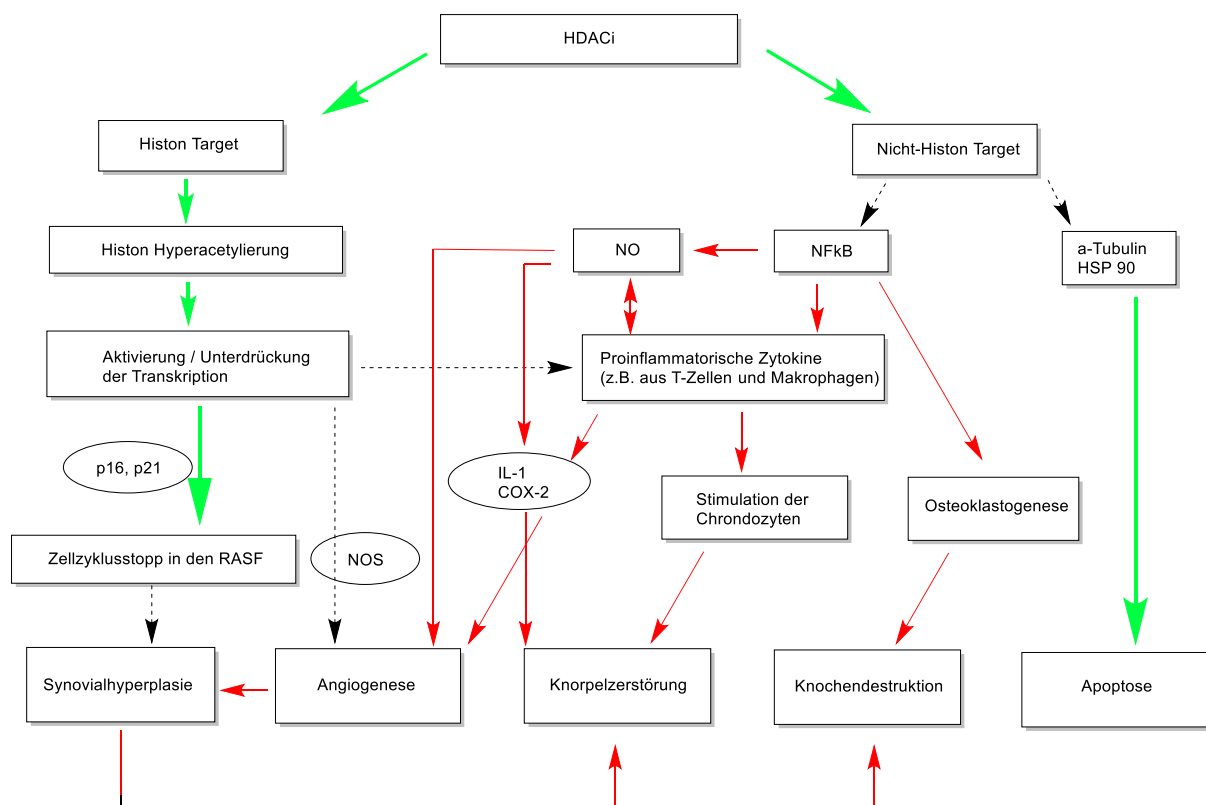
Bei den bisherigen Therapieformen gibt es eine viele Patienten, die nicht ausreichend darauf ansprechen und bei denen ein Langzeiteffekt ausbleibt.<sup>235</sup> Zudem sind die hohen Therapiekosten, die Abnahme der Effizienz bei wiederholter Gabe von Antikörpern (z.B. von TNF $\alpha$ -Antikörper)<sup>247</sup> sowie die parenterale Applikation nachteilig.<sup>235</sup>

Antizytokin-Therapien stellen im Vergleich zur Glukokortikoid-Therapie, die bei Langzeitanwendung zu metabolischen Schwierigkeiten führt, eine Verbesserung dar.<sup>282</sup> Grundsätzlich erweist sich damit eine gegen Zytokine-gerichtete Therapie als Fortschritt, wenn die Problematik der parenteralen Gabe sowie des erhöhten Infektionsrisikos nicht gegeben wären.<sup>282</sup>

Extrazelluläre Stimuli vermitteln Nachrichten über Transkriptionsfaktoren an den Zellkern über entsprechende Promoterregionen auf den entsprechenden Genen.<sup>285</sup> Daher könnte die Modulation der Transkription durch Epigenetik eine mögliche Herangehensweise sein.<sup>285</sup> Die orale Gabe aktiver HDACi, die ebenfalls in die Zytokinkaskade eingreifen, könnte damit einen wichtigen Schritt zur Optimierung der RA-Therapie beitragen.<sup>282</sup> Durch HAT-Aktivität kommt es zur Chromatinentspannung, ein Zustand, der das Binden von Transkriptionsfaktoren ermöglicht und deshalb zur Aktivierung führt, demnach auch zur Aktivierung der Transkription inflammatorischer Gene.<sup>285</sup> HDAC wirkt diesem Prozess entgegen, indem es zur Chromatinkondensation führt und damit dazu beiträgt, dass Transkriptionsfaktoren keinen Zugang zu den Promoterregionen der Gene haben.<sup>285</sup> HDACis benötigen keine speziellen Membrankanäle, sondern gelangen mittels einem Konzentrationsgradienten in die Zelle.<sup>282</sup> Epigenetische Regulationen weckten zunächst in der Krebstherapie hohe Aufmerksamkeit und führten zu den ersten Zulassungen dieser im Jahr 2006 (Vorinostat, SAHA, (1)).<sup>243</sup> In verschiedenen prä-klinischen Modellen zeigten HDACi neben ihren anti-neoplastischen Eigenschaften auch anti-inflammatorische Effekte, die im Folgenden erläutert werden.<sup>243</sup>

Der genaue Mechanismus, der dem anti-rheumatische Effekt von HDACi zugrunde liegt, ist weiterhin unklar.<sup>243,247,263</sup> Es wird vermutet, dass sie ihre anti-rheumatische Aktivitäten über die Modulation von Genen entfalten, die in die Entzündungskaskade der RA involviert sind.<sup>243</sup> Die anti-rheumatischen Effekte von HDACi können in zwei wesentliche Hauptsignalwege unterteilt werden: Unterdrückung der Proliferation von RASF und

Beeinflussung von proinflammatorischen Zytokinen oder Chemokinen.<sup>243</sup> Außerdem spielen die anti-angiogene und protektive Wirkung auf Knochen und Knorpel eine untergeordnete Rolle.<sup>243</sup> Erste Beweise für die pharmakologischen Aktivitäten von HDACi in Modellen für inflammatorische Erkrankungen wurden 2003 publiziert.<sup>243,285</sup> Es wurde festgestellt, dass durch HDACi (Trichostatin A (TSA, **2**) und Phenylbutyrat (PB)) die Synovialhyperplasie und die Knochenerosion reduziert wurden, in der Synovialmembran die TNF $\alpha$ -Expression abnahm, während die p16 und p21 sowie acetylierte Histone in größerer Menge vorlagen.<sup>243,285</sup> Ähnliche Beobachtungen wurden von Nakamura *et al.* 2005 mit FK228 (Romidepsin, **4**) gemacht, welches bei Gabe vor Auslösung der Arthritis Gelenkentzündungen vorbeugen und bei Gabe nach Beginn der Arthritis durch Expression von IFN- $\beta$ , einem Osteoklasteninhibitionsprotein, die Osteoklastenaktivität unterdrücken konnte.<sup>285</sup> Lin *et al.* 2007 testeten Vorinostat (**1**) und MS 275 (**5**) im Tiermodell und stellten ebenfalls fest, dass diese HDACi in der Lage waren, die Entzündung im Gelenk zu reduzieren, indem sie die Produktion proinflammatorischer Zytokine drosselten.<sup>285</sup>



**Abb. 7.5.** Antirheumatische Wirkungen von HDACi. Durchgezogene fettgedruckte grüne Linien stehen für eine Aktivierung, durchgezogene rote Linien stehen für blockierte Aktivierung und gestrichelte Linien stehen für Inhibition. Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an Lit.<sup>243</sup>

Die schematische Darstellung der antirheumatischen Wirkungen von HDACi wird im Folgenden beschrieben.

### 7.6.1 Effekt auf die RA-Synovialfibroblasten

Im entzündeten Gelenk wurden die Synovialfibroblasten epigenetisch modifiziert zugunsten eines inflammatorischen Phänotyps, der seine aggressive pro-inflammatorische Eigenschaft beibehält und dazu führt, dass die veränderten Synovialfibroblasten in die Knorpelmatrix wandern.<sup>239</sup> Durch die Freisetzung von Zytokinen, RANKL und Proteasen kommt es zur Verstärkung des Entzündungsgeschehens und zum Abbau der Matrix, die dann letztlich in einer Knochen- und Knorpeldestruktion endet.<sup>239</sup> Diese Beobachtung konnte bei einem Transfer transformierter Synovialfibroblasten in das Gelenk einer gesunden Maus gemacht werden.<sup>239</sup> Bisherige Literaturdaten belegen, dass veränderte Histonacetylierungen und DNA-Methylierungen die Biologie der Synovialfibroblasten regulieren können und damit den Einsatz von HDACi rechtfertigen.<sup>260</sup>

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Gabe von TSA (**2**), als auch von PB zu einer irreversiblen Hemmung der RASF führt, wohingegen nicht transformierte Synovialfibroblasten (= „normale“) unbetroffen bleiben.<sup>243,247</sup> Diese irreversible Hemmung hängt damit zusammen, dass Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) hoch reguliert werden, da zunächst eine erhöhte Expression von p21 und p16 vorliegt. Nach Abfluten des HDACi nimmt die Expression von p21 ab, während die von p16 (Tumorsuppressorprotein), der den Zellzyklus von der G<sub>1</sub>- zur S-Phase verlangsamt, weiterhin erhöht bleibt. Im Adjuvant-Arthritis-Modell konnte gezeigt werden, dass p16 und p21 auch nach Behandlung mit HDACi nicht in „normalen“ Synovialozyten zu finden waren, wohingegen bei arthritischen Zellen p16 vom ersten Tag an konstant vorhanden war, während der Zellzyklusinhibitor p21 nur in den ersten Tagen induziert wurde.<sup>247</sup> Die Wachstumshemmung durch HDACi tritt bereits nach 12 Std in RASF auf und in gesunden Zellen erst nach 24 Std während der, durch die HDACi-bedingte, Alterungsprozess ebenfalls nur die RASF betrifft.<sup>243,247</sup> Somit kann durch die Gabe von HDACi als Therapeutika zwischen normalen Synovialozyten und RASF differenziert und damit das Spektrum an Nebenwirkungen verkleinert werden.<sup>243,247</sup> An dieser Stelle ist ebenfalls wichtig zu erwähnen, dass diese Wachstumshemmung nicht auf unspezifische zytotoxische Effekte zurückzuführen ist, da „normale“ Synovialfibroblasten weiterhin lebensfähig bleiben.<sup>243,247</sup> Die Induktion von p16 wird mit der Histonacetylierung der p16-Promotorregion in Verbindung gebracht und erklärt damit den gemeinsamen Signalweg von CDK-Inhibitoren und HDACi.<sup>243</sup> Alle HDACi können die Expression von p21 induzieren, welche zu einem Zellzyklusstopp in der G<sub>1</sub>-Phase

führt, wohingegen nur einige wenige HDACi (PB, TSA (2) und FK228 (4)) auch p16 induzieren können.<sup>243</sup>

### 7.6.2 Hemmung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine

TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 scheinen die wichtigsten Zytokine in der Entzündungskaskade von RA zu sein (s. **Abb. 7.4**), wobei die beiden erstgenannten in besonders hoher Menge in der Synovialflüssigkeit und im Synovialgewebe vorkommen und einen synergistischen Effekt bezogen auf andere Zytokine und Proteasen aufweisen.<sup>243</sup> In der RA sind Makrophagen und T-Zellen die Hauptproduzenten proinflammatorischer Zytokine.<sup>188</sup> Die Aktivierung sowie die Apoptose der Makrophagen werden über Acetylierung und Deacetylierung von Histonen reguliert.<sup>188</sup> Anti-rheumatische Aktivitäten, die durch die Gabe von HDACi beobachtet werden konnten, wurden stets von der Suppression von proinflammatorischen Zytokinen (TNF $\alpha$ , IL-1 und IL-6) begleitet.<sup>243</sup> Es ist auch denkbar, dass HDACi die Zytokin-gesteuerten Effekte verhindern, indem die NF $\kappa$ B-Aktivität herunterreguliert wird.<sup>282</sup> Des Weiteren ist eine durch HDACi erhöhte Genexpression an anti-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 und IL-10, möglich.<sup>282</sup> Ein weiterer hypothetischer Mechanismus, über den HDACi ihren Effekt auf die Zytokinproduktion ausüben, ist die Beeinflussung der mRNA-Stabilität.<sup>248,263</sup> Studien in der Krebstherapie, in der HDACi ihren ursprünglichen Einsatz fanden, liefern ebenfalls Ergebnisse, die diese Hypothese stützen.<sup>263</sup> Es konnte beobachtet werden, dass die durch HDACi hervorgerufene Suppression von TNF $\alpha$ , IL-1 im Synovialgewebe und die damit verbundene Reduktion von Knochenschädigungen und Entzündungen bereits in geringen Konzentrationen vom HDACi effektiver war, als jene, die durch MTX-Gabe erzielt werden konnte.<sup>235</sup>

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein proinflammatorisches Chemokin, welches in Form seiner Folgeprodukte Nitrit und Nitrat in der Synovialflüssigkeit, im Urin und im Serum von RA-Patienten nachgewiesen werden kann.<sup>243</sup> Das Enzym Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) katalysiert die Bildung von \*NO aus der Aminosäure L-Arginin.<sup>243</sup> Ob HDACi (z.B. PB und SAHA (1)) direkt inhibitorische Effekte auf die \*NO-Produktion ausüben oder über die Hemmung proinflammatorischer Zytokine (TNF $\alpha$ , IL-1 und IL-6) bzw. proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren (z.B. NF- $\kappa$ B), ist noch nicht eindeutig geklärt.<sup>243</sup>

### 7.6.3 Hemmung der Angiogenese

Besonders in der frühen Phase der RA ist die Angiogenese einerseits aktiv, um die hypertrophe Synovialmembran mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen, und auf der anderen Seite ermöglicht sie den weiteren Einstrom von proinflammatorischen Zellen in das schon bereits betroffene Gelenk.<sup>243</sup> HDACi mit spezifischer Aktivität gegenüber der HDAC Klasse II haben sich als effektive Inhibitoren des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF 1  $\alpha$ ) erwiesen.<sup>243</sup> Dieser Transkriptionsfaktor ist insbesondere für die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff verantwortlich. Bei Normoxie (Idealzustand der Sauerstoffversorgung) erfolgt eine Hydroxylierung an zwei Propyl-Resten der  $\alpha$ -Untereinheit. Der Abbau erfolgt dann über das van Hippel Lindau-Protein (VHL). HDAC4 und 6 können bei Vorliegen einer Hypoxie, bei der eine Hydroxylierung des HIF 1  $\alpha$  nicht möglich ist, eine vom VHL unabhängige Hemmung vornehmen.<sup>243</sup> Da bei Hypoxie das HIF 1  $\alpha$ , den Wachstumsfaktor VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) aktiviert, um die Sauerstoffversorgung auf anderem Wege zu gewährleisten, wird bei Gabe von HDACi durch seinen hemmenden Effekt auf das HIF 1  $\alpha$  das VEGF ebenfalls indirekt gehemmt.<sup>235,243</sup> Diese anti-angiogenetischen Effekte der HDACi sind zwar in verschiedenen präklinischen Modellen dokumentiert, vor allem im Bereich der Onkologie, allerdings ist jener Einfluss nicht speziell bei RA-ausgerichteten-Modellen erprobt worden.<sup>243</sup> Eine anti-angiogenetische Wirkung allein wird nicht reichen, um die RA kontrollieren zu können, da vermehrte Angiogenese hauptsächlich in den frühen Stadien der RA auftritt.<sup>243</sup> Nichtsdestotrotz könnte eine Angiogenese-hemmende Wirkung von HDACi unterstützend wirken.<sup>243</sup>

### 7.6.4 Einfluss auf die Knorpel- und Knochendestruktion

Weil HDACi proinflammatorische Zytokine, wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 hemmen, kommt es zu einer Abnahme der MMPs, sodass die extrazelluläre Matrix geschützt wird.<sup>243,282</sup> Deformationen und Destruktionen der Gelenke sind Hauptmerkmale der RA und werden hauptsächlich durch Osteoklastenaktivität hervorgerufen.<sup>243</sup> Damit es zu dieser Aktivierung kommt, muss der Ligand RANKL an seinen Rezeptor RANK binden. RANKL wird seinerseits durch TNF $\alpha$  und / oder IL-1 induziert, welche wiederum durch HDACi gehemmt werden.<sup>243</sup> Die protektive Wirkung der HDACi auf das Gelenk kann einerseits durch die Hemmung proinflammatorischer Zytokine und andererseits durch den Einfluss auf Interferon  $\beta$  (IFN  $\beta$ ) erklärt werden, welches seinerseits als Inhibitor der Osteoklastogenese fungiert.<sup>243,282</sup> HDACi haben einen chondroprotektiven Effekt im Rahmen der Arthritis, da sie

in der Lage sind, die Expression abbauender Proteinasen, welche wiederum von Chondrozyten gebildet werden, zu hemmen. Zudem fördern sie die Proteoglykansynthese durch verringerte Chondrozyteninhibition.<sup>235</sup> Durch das Eingreifen der HDACi in die Proliferation der RASF werden inflammatorische Mediatoren, die von diesen Zellen ausgehen, vermindert.<sup>235</sup>

Die antiinflammatorischen Wirkungen der HDACi sind nicht allein durch die Hyperacetylierung von nukleären Histonen und der damit erhöhten Expression von proapoptotischen Genen zu erklären. Vielmehr ist die Erklärung, warum geringe Konzentrationen an HDACi für die antiinflammatorische Wirkung ausreichen, in der Acetylierung zytoplasmatischer Proteine (z.B. Transkriptionsfaktoren oder Proteine, die in Signalwege eingebunden sind) zu finden.<sup>248,282,285</sup> Neben der nur niedrigen Konzentration, die eingesetzt werden muss, ist die Tatsache, dass sie oral applizierbar sind, ein weiterer Vorteil der HDACi.<sup>282</sup> In den Dosierungen, in denen sie für die Krebstherapie verwendet werden, führen sie zu gastrointestinalen Veränderungen, die hier jedoch nicht zu befürchten sind.<sup>282</sup> Bei einem Einsatz von HDACi sollte das Ziel sein, möglichst selektive Inhibitoren einzusetzen, um Interferenzen mit physiologischen Signalwegen zu minimieren und damit die Nebenwirkungen zu reduzieren.<sup>243</sup> In der Studie von Gillespie *et al.* wurde festgestellt, dass es keinen Unterschied in den HAT-Levels bei RA- und Kontrollpatienten gibt. Im Gegensatz dazu ist die HDAC-Aktivität in den Leukozyten, signifikant erhöht. Sie trägt damit möglicherweise zur RA-Pathogenese bei, indem die Leukozyten RASF aktivieren und zur Gelenkdestruktion führen.<sup>248</sup> Durch Gabe von anti-TNF $\alpha$ -Therapeutika kann diese Dysregulation nicht beeinflusst werden. Das bietet eine denkbare Erklärung, warum TNF $\alpha$ -Inhibitoren keine ausreichende Wirkung bei allen RA-Patienten zeigen.<sup>248</sup> Auch wenn noch nicht vollständig geklärt ist, ob die RA-Pathogenese durch HDAC oder / und HAT angetrieben wird, kann die antiinflammatorische Wirkung der HDACi von Nutzen für die Therapie sein.<sup>243</sup> Daher wäre eine Kombination aus DMARDs und HDACi denkbar, um die Progression der Erkrankung adäquat zu bremsen.<sup>243</sup> Der Erfolg von HDACi in der Therapie inflammatorischer Erkrankungen wird davon abhängen, ob Organtoxizitäten auch bei Langzeitanwendung ausgeschlossen werden können, wie hoch die Verträglichkeit ist und ebenso von der Spezifität der einzelnen Inhibitoren.<sup>282</sup>



## 7.7 Voruntersuchungen zur Testung im *in vivo*-Tiermodell

Wie in den Kap. 5.2.8-5.2.10 gezeigt, wurden die Leitverbindung Marbostat-100 (**13a**), sowie ihre Derivate umfangreich im Rahmen von *in vitro*-Studien hinsichtlich ihrer Struktur-Wirkungsbeziehungen untersucht. Dabei wurde Tubastatin A (**10**) - ein selektiver HDAC6i - als Vergleichssubstanz herangezogen, um Marbostat-100 (**13a**) in Bezug auf seine selektiven inhibitorischen Fähigkeiten zu prüfen. Tubastatin A (**10**) schien die geeignetste Vergleichssubstanz zu sein, da andere HDAC6i, wie HPB (*Hexaphenylbenzene*) und ACY-1215 (**9**), bereits *in vitro* weniger potent als **13a** sind: HPB muss in  $\mu\text{M}$ -Bereich dosiert werden, um eine Tubulin-Hyperacetylierung hervorzurufen, und ACY-1215 (**9**) verliert seine Präferenz für HDAC6, wenn es in einer Dosis appliziert wird, die für einen signifikanten Effekt erforderlich ist.<sup>48,286</sup>

Aufgrund der vielseitigen Funktionen der HDAC6 (s. Kap. 7.6 und 1.3.3) wurde diese Isoform zu einem attraktiven Target in der Krebstherapie (s. Kap. 1.3.3.2).<sup>48</sup> Da die für RA charakteristische Knorpeldestruktion hauptsächlich auf FLS zurückzuführen ist und diese krebsähnliche Eigenschaften (uneingeschränkte Proliferation, invasives Verhalten) aufweisen (s. Kap. 7.6.1), liegt die Vermutung nahe, dass HDAC6i auch bei der RA-Therapie effektiv sein könnte.<sup>48</sup> Neben der Wirkung auf die FLS konnte auch gezeigt werden, dass HDAC6i die suppressive Aktivität regulatorischer T-Zellen verstärken.<sup>188</sup>

In den Zelltestungen konnte festgestellt werden, dass Marbostat-100 (**13a**) in Bezug auf die Hyperacetylierung des  $\alpha$ -Tubulins dem Tubastatin A (**10**) sowohl in einem Langzeittest (s. Kap. 5.2.10.1; **Abb. 5.15** (B)) als auch in seiner Selektivität und inhibitorischen Stärke ebenbürtig oder sogar teilweise überlegen ist. Zudem ergaben die *in vitro*-Testungen (s. Kap. 5.2.10.1; **Abb. 5.15** (A)), dass erst die 100-fach höhere Konzentration an **10** mit **13a** vergleichbare Ergebnisse lieferte. Diese Resultate führten dazu, die *in vivo*-Wirksamkeit der Leitverbindung **13a** in einem inflammatorischen Mausmodell zu testen.

## 7.8 Testung der *in vivo*-Wirksamkeit von Marbostat-100 (13a) und Derivaten

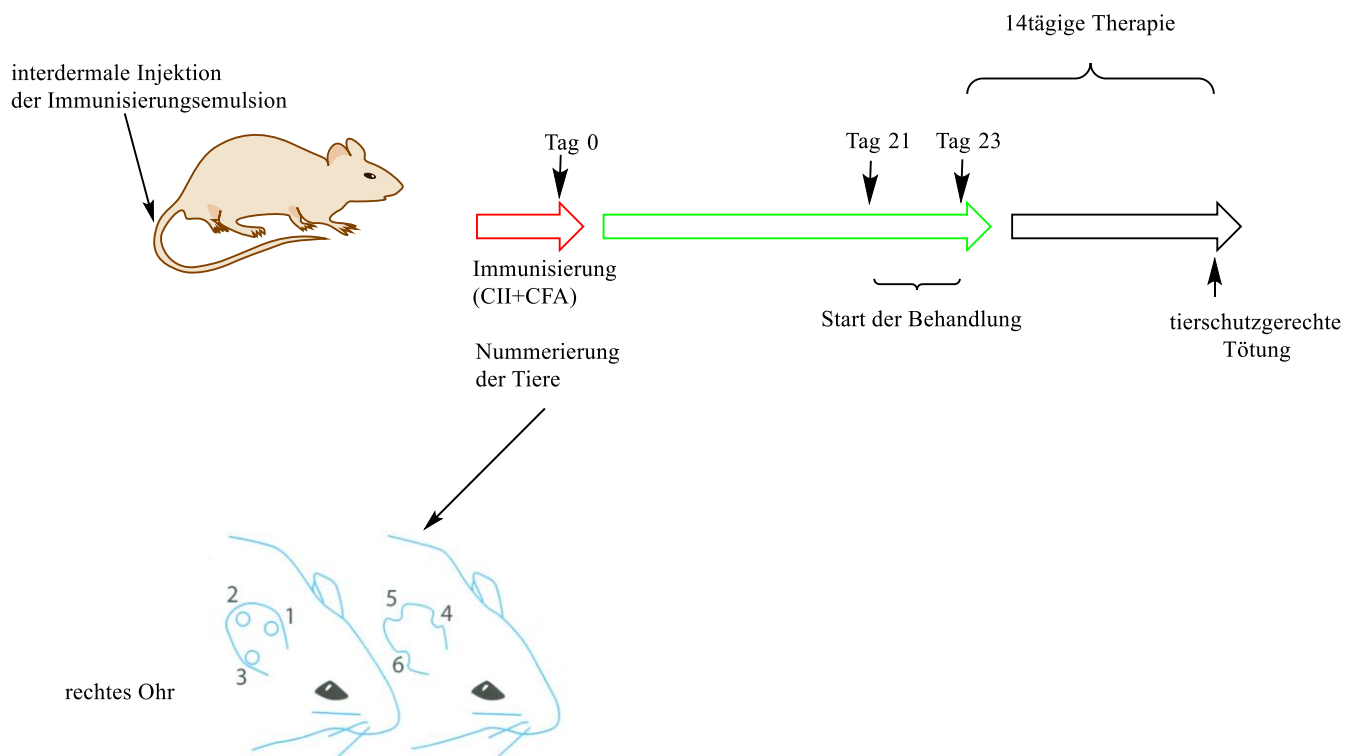
Wie in Kap. 7.3 erwähnt, gibt es eine Vielzahl verschiedener etablierter Mausmodelle, die sich zur Untersuchung antiarthritischer Effekte eignen. Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Straub (Labor für Neuro-, Endokrino- und Immunologie, Abteilung für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg) fiel die Wahl auf das CIA-Modell.

Im CIA-Modell wird das komplette Immunsystem selbst aktiviert, womit die körpereigene Immunantwort in Gang gebracht wird, die letztlich zur Antikörper-Bildung führt. Dieser Prozess der Entstehung des Entzündungsgeschehens sowie die daraus resultierenden histologischen Aspekte kommen dem am Menschen beschriebenen Prozess am Nächsten.<sup>238</sup> Damit wird im Gegensatz zu anderen Modellen (wie z.B. K/BxN oder CAIA) sowohl die Aktivierungs- als auch die Effektorphase der Immunantwort erfasst.<sup>274</sup> Zudem gehört das CIA-Modell zu dem am häufigsten verwendeten Arthritis-Modell. Daher existieren bereits sehr definierte Durchführungen, sodass eine gute Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit gegeben sind.

Im CIA-Modell werden die klinischen Symptome der RA durch Injektion einer Emulsion - bestehend aus bovinem Kollagen Typ II und CFA - ausgelöst, wodurch es zur Aktivierung von Immun- und Komplementsystem kommt.<sup>287,288</sup> Das CFA besteht aus einer Wasser - in - Öl - Emulsion, wobei die hitze-inaktivierten Mykobakterien sich in der wässrigen Phase befinden.<sup>289,290</sup> Diese wirken als Antigene und verstärken damit das bereits durch bovines Kollagen Typ II angeregte Immunsystem zusätzlich in der Immunantwort.<sup>289,290</sup> Bei der Öl-Phase handelt es sich um Paraffinöl, welches die Funktion einer Depotwirkung erfüllt, da es nicht verstoffwechselt werden kann und damit die Antikörper-Bildung verlängert.<sup>290</sup> Eine Öl - in - Wasser - Emulsion wäre ineffektiv, da davon ausgegangen werden kann, dass keine ausreichende Kohärenz gewährleistet ist.<sup>290</sup> Im Gegensatz zum CFA, fehlt dem ICFA der Zusatz von hitze-inaktivierten Mykobakterien. Durch deren Abwesenheit ist die Gefahr lokaler Entzündungen an der Einspritzstelle geringer.

Publikationen von Trentham *et al.*<sup>276</sup> und Courtenay *et al.*<sup>277</sup> zeigen, dass durch die alleinige Gabe des bovinen Kollagens Typ II eine Immunantwort ausgelöst wird, die nicht ausreicht, um eine Arthritis zu induzieren. Sie stellten weiterhin fest, dass eine Immunisierung mit einer

Emulsion bestehend aus Kollagen Typ II und ICFA eine deutlich spätere Auslösung der Erkrankung zur Folge hat und die Inzidenz nur bei 67 % lag (100 % bei der Kombination mit CFA).



Quelle: The Laboratory Mouse, 2004 Elsevier Limited, S.402

**Abb. 7.6.** Graphische Darstellung des *in vivo*-Versuchsablaufs.

Die im Folgenden beschriebene *in vivo*-Studie wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Hubert Stangl (Arbeitskreis Prof. Dr. Straub, Labor für Neuro-, Endokrino- und Immunologie, Abteilung für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg) durchgeführt, wobei Dr. Stangl die statistische Auswertung übernahm. Die Immunisierung erfolgte an Tag 0 intradermal in die Schwanzbasis mittels einer Emulsion bestehend aus bovinem Kollagen Typ II und CFA (s. **Abb. 7.6**). Nach einer Immunisierung in die Schwanzbasis schwellen die Vorder- und Hinterpfoten.<sup>247</sup> Um die Gewichtsveränderungen verfolgen und die Tiere innerhalb der Gruppen (Vehikel, Kontrolle, Behandlungsgruppen) identifizieren zu können, wurden an Tag 0 neben der Gewichtsbestimmung auch die Ohrlöcher gestochen. (s. **Abb. 7.6**). Nach der Immunisierung wurden die Tiere täglich hinsichtlich erster Entzündungsanzeichen untersucht (Rötung und / oder Schwellung), gewogen und gescored.

Um den Grad der Erkrankung (klinischer-arthritischer Score) einzuordnen und damit einen Start der Therapie festlegen zu können, wurden Punkte vergeben, wie im pharmakologisch experimentellen Teil (s. Kap. 10.7.1) beschrieben. Im CIA-Modell unterliegt der Beginn der Erkrankung einer gewissen Streuung, da die Schwellungen / Rötungen der Gelenke zu unterschiedlichen Zeiten in den jeweiligen Pfoten erfolgen.<sup>277</sup> Des Weiteren wurde in der Literatur häufig beobachtet, dass die vorderen Pfoten nur zu 10 % betroffen sind.<sup>276</sup> Die Feststellung, dass die vorderen Pfoten schwächer betroffen sind als die Hinterpfoten, ließ sich auch in unseren Versuchen beobachten. Um möglichst viele Tiere gleichzeitig mit der Therapie starten zu lassen, wurde ein Scorebereich (8-11 Scorepunkte pro Tier) festgelegt. Sobald alle Tiere bezogen auf die Scorewerte in diesem Bereich lagen, wurde die Therapie gestartet. Nach 12-14 Behandlungstagen erfolgte an Tag 15 die tierschutzgerechte Tötung unabhängig davon, wann für das einzelne Tier die Therapie begonnen hatte (s. **Abb. 7.6**), um einen einheitlichen Endzeitpunkt zu gewährleisten.

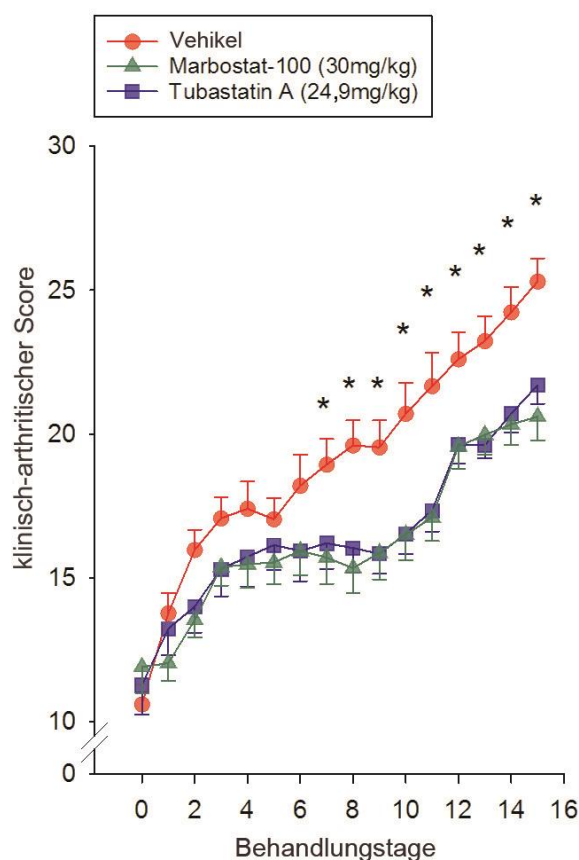
Die zu testende Leitverbindung Marbostat-100 (**13a**) sollte zunächst *in vivo* mit den vom Tubastatin A (**10**) hervorgerufenen Wirkungen verglichen werden. Zur Dosisfindung von **13a** wurde die Literatur hinsichtlich einer etablierten Dosis von HDACi mit ähnlichen *in vitro*-Ergebnissen durchsucht. Lee *et al.*<sup>48</sup> berichteten von einer signifikanten Reduktion des klinischen Scores bei einer täglichen Gabe von 100 mg / kg Tubastatin A (**10**), während bei einer Gabe von 10 mg / kg oder 50 mg / kg noch kein signifikanter Unterschied erkennbar war. Da die von Lee *et al.*<sup>48</sup> gewonnenen Ergebnisse ähnlich zu denen von Marbostat-100 (**13a**) waren, wurde die Leitverbindung in einer Dosis von 30 mg / kg in den *in vivo*-Versuch aufgenommen. Die Dosis wurde geringer angesetzt als die für **10** in der Literatur gewählte, da wir bereits *in vitro* zeigen konnten, dass **13a** in geringeren Konzentrationen als **10** eine sehr ausgeprägte Inhibition zeigt (s. Kap. 5.2.10.1).

Wie in den *in vitro*-Voruntersuchungen gezeigt werden konnte, handelt es sich bei Marbostat-100 (**13a**) um einen hoch selektiven HDAC6i (s. Kap. 5.2). In der Literatur konnte bereits am Beispiel von Tubastatin A (**10**, selektiver HDAC6i) gezeigt werden, dass der Einsatz von HDAC6i im *in vivo*-RA-Mausmodell seine Berechtigung hat.<sup>48</sup>

## 7.9 Ergebnisse

### 7.9.1 Untersuchung von Marbostat-100 (13a) im Tiermodell

Die ersten klinischen Anzeichen einer RA (Rötung / Schwellung) traten bei allen Gruppen 20 Tage nach der Immunisierung auf (s. **Abb. 7.6**). Nach weiteren 2-3 Tagen lag der Arthritiscore aller Versuchstiere im festgelegten Scorebereich (s. Kap. 10.7.1), sodass mit der intraperitonealen (i.p) Therapie begonnen werden konnte.

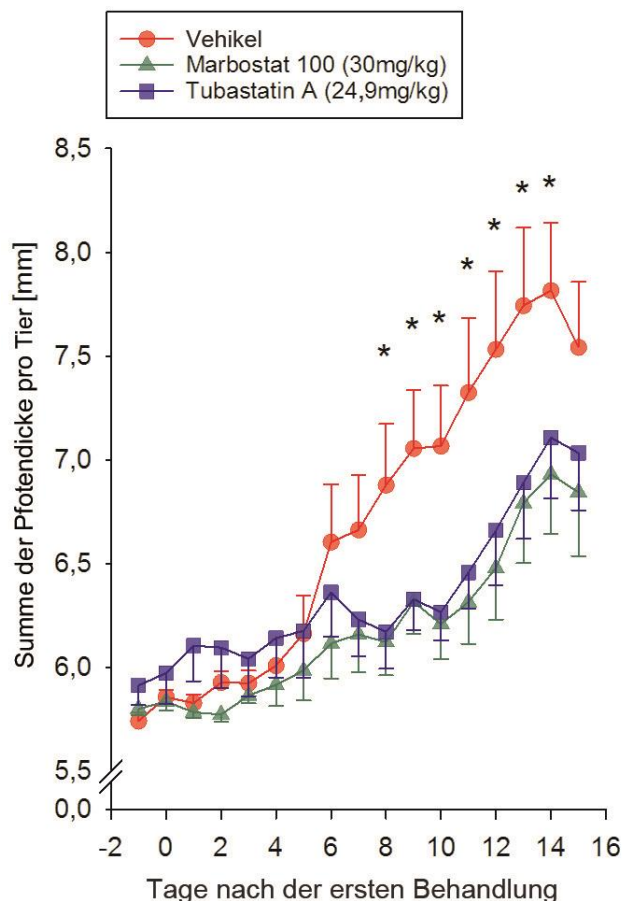


**Abb. 7.7.** Darstellung des klinisch-arthritischen Scores nach einer Behandlung mit Marbostat-100 (**13a**) und Tubastatin A (**10**). Die abgebildete Grafik wurde von Dr. Hubert Stangl erstellt. [\* = signifikanter Unterschied.]

Während alle Gruppen an Tag 0 der Behandlung einen Scorewert im Bereich von 10-11,5 aufwiesen, nahmen die Entzündungssymptome (Scorewerte) bei der Vehikelgruppe im weiteren Verlauf der Behandlung sukzessiv zu (s. **Abb. 7.7**). Bereits nach sieben Therapietagen lag der Arthritiscore fast beim doppelten Wert (19), während die mit Marbostat-100 (**13a**) und Tubastatin A (**10**) behandelten Tiere bei Betrachtung desselben Zeitraumes einen Scorewert von 15,2 bzw. 15,4 bei einem leicht höherem Startwert (11,0 / 11,5) aufwiesen. Demnach konnte ab Behandlungstag 7 von einer signifikanten Reduktion der Symptome bedingt durch die Therapie gesprochen werden, die bis zum Versuchsende bestehen blieb

(s. **Abb. 7.7**). Ein Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen ist nicht signifikant, womit der Einfluss von Marbostat-100 (**13a**) auf den klinisch-arthritischen Score vergleichbar mit dem des etablierten Tubastatin A (**10**) ist (s. **Abb. 7.7**). Trotz weiteren Anstiegs des klinisch-arthritischen Scores auch in den Behandlungsgruppen konnte durch die Gabe von Marbostat-100 (**13a**) dieser um etwa 20 % gesenkt werden.

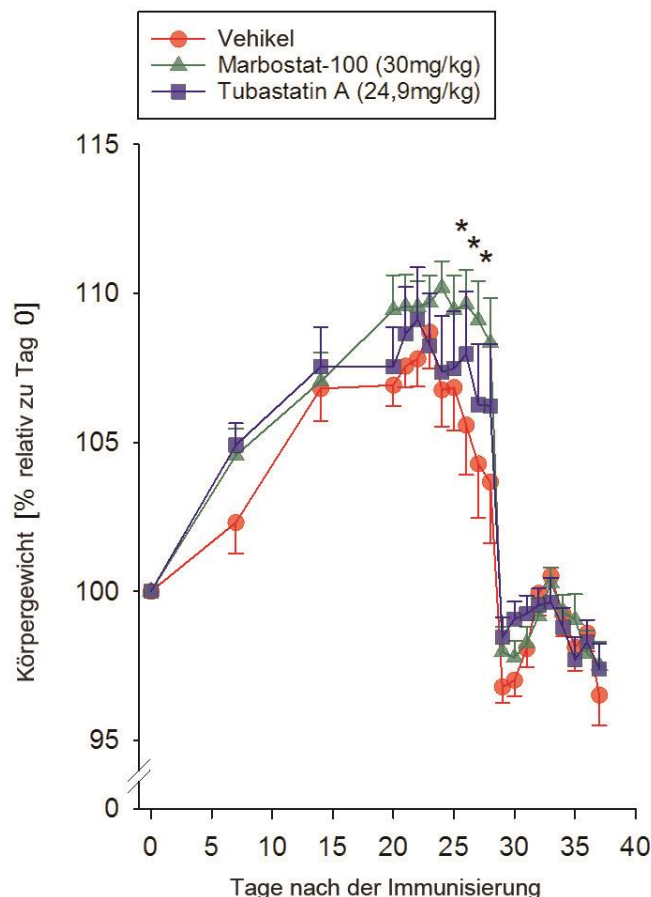
Zur Überwachung der täglichen Progression der Arthritis wurde neben dem klinisch-arthritischen Score auch die Pfortendicke mittels Kaliper (Fa. Kroeplin, Schlüchtern, Deutschland) sowie das Körpergewicht gemessen. Somit wird die rein visuelle Betrachtung (klinisch-arthritischer Score) durch eine messbare Größe ergänzt, die es ermöglicht, den Grad der Erkrankung objektiv zu bestimmen.



**Abb. 7.8.** Darstellung der Pfortendicke nach einer Behandlung mit Marbostat-100 (**13a**) und Tubastatin A (**10**). Die abgebildete Grafik wurde von Dr. Hubert Stangl erstellt. [\* = signifikanter Unterschied.]

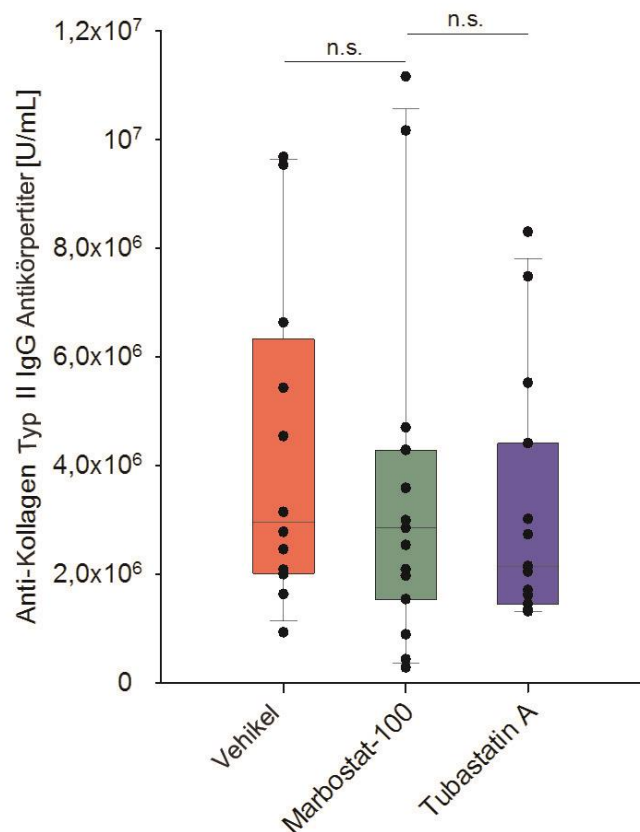
Bei Betrachtung der Pfortendicke über alle Gruppen ist bis zum 5. Behandlungstag kein Unterschied erkennbar (s. **Abb. 7.8**). Ab dem 6. Tag zeichnet sich eine positive Wirkung auf den Pfortenumfang durch Gabe von Marbostat-100 (**13a**) ab. Da die Zunahme des Pfortenumfanges mit der Zunahme des Schwellungsgrades einhergeht und diese wiederum

durch Entzündungsprozesse vorangetrieben wird, kann Marbostat-100 (**13a**) eine signifikante Reduktion der Schwellung (ab Tag 8) im Vergleich zur Vehikelkontrolle zugesprochen werden (s. **Abb. 7.8**).



**Abb. 7.9.** Darstellung des Körpergewichtes nach einer Behandlung mit Marbostat-100 (**13a**) und Tubastatin A (**10**). Die abgebildete Grafik wurde von Dr. Hubert Stangl erstellt. [\* = signifikanter Unterschied.]

Das Monitoring des Körpergewichtes der Versuchsmäuse wurde standardmäßig durchgeführt, da sowohl ein beschleunigter als auch ein stärker ausgeprägter Gewichtsverlust im Vergleich zum Vehikel (bedingt durch die Therapie) als Abbruchkriterium für den Versuch galt (s. Tierantrag). Die **Abb. 7.9** zeigt zunächst einen Anstieg des Gewichtes in allen Gruppen. Ab Tag 20 begannen die ersten Tiere mit der Therapie und spätestens ab Tag 25 erhielt jedes Tier in der Behandlungsgruppe den jeweiligen HDAC6i (Marbostat-100 (**13a**) oder Tubastatin A (**10**)). Ab diesem Zeitpunkt zeichnete sich ein signifikanter Unterschied zur Vehikelgruppe ab, die deutlich mehr Gewicht verlor (s. **Abb. 7.9**). Der therapeutische Effekt ist bei diesem durchgeführten Tierversuch in den ersten Tagen nach Ausbruch der Erkrankung am stärksten (s. **Abb. 7.9**) und zeigt um den Tag 28 einen Gewichtsverlust auf, der typisch für das gewählte Modell ist.



**Abb. 7.10.** Darstellung des Anti-Kollagen Typ II Antikörpertiters nach einer Behandlung mit Marbostat-100 (13a) und Tubastatin A (10). Die abgebildete Grafik wurde von Dr. Hubert Stangl erstellt. [n.s. = nicht signifikant.]

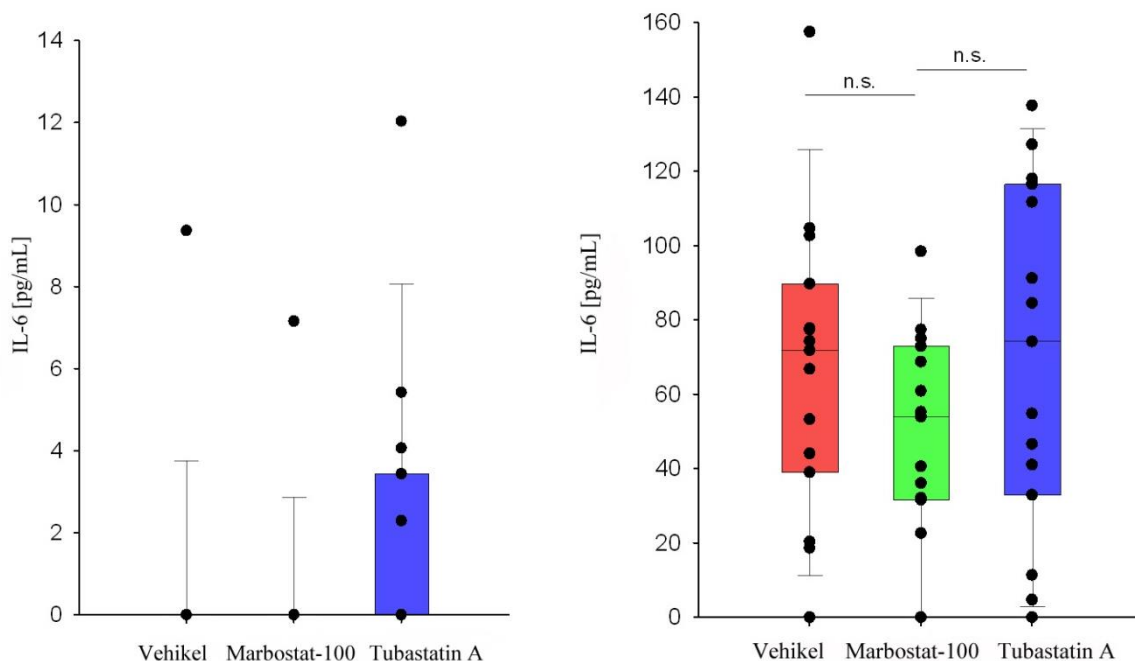
Als Biomarker für das CIA-Modell kann der Anti-Kollagen Typ II IgG Antikörper (Cayman Chemical Kit) verwendet werden, dessen Menge im Zusammenhang mit der Entzündung der RA steht. Nach der in Kap. 7.8 beschriebenen Immunisierung entwickelten die Tiere eine autoimmun-gerichtete Polyarthrit, die sich klinische, histologische und immunologische Parameter mit der humanen RA teilt.<sup>291,292</sup> Die Immunantwort auf das Kollagen Typ II ist zum einen charakterisiert durch die Stimulation von Kollagen-spezifischen T-Zellen und zum anderen durch die Produktion von Antikörpern, die gegen das heterologe und das autologe Kollagen Typ II aktiv sind, wobei das Letztere von beiden für die Entwicklung der CIA verantwortlich ist.<sup>292-294</sup> Um das Maß der Immunantwort auf die Immunisierung zu ermitteln, wurde die Konzentration von Anti-Kollagen-Typ II (s. **Abb. 7.10**) bestimmt.

Wie **Abb. 7.10** veranschaulicht, kann der klinische Unterschied (s. **Abb. 7.7**) zwischen Vehikel und den beiden Behandlungsgruppen nicht auf die Menge an Antikörpern gegen Kollagen Typ II zurückgeführt werden. Eine denkbare Erklärung dafür ist in der Zielsetzung



des Versuches zu finden. In dieser Studie wurde der therapeutische anstelle des prophylaktischen Ansatzes gewählt, da die Behandlung erst nach Ausbruch der Erkrankung erfolgte und somit vermutlich die Antikörper-Produktion schon bereits vollständig initiiert wurde.

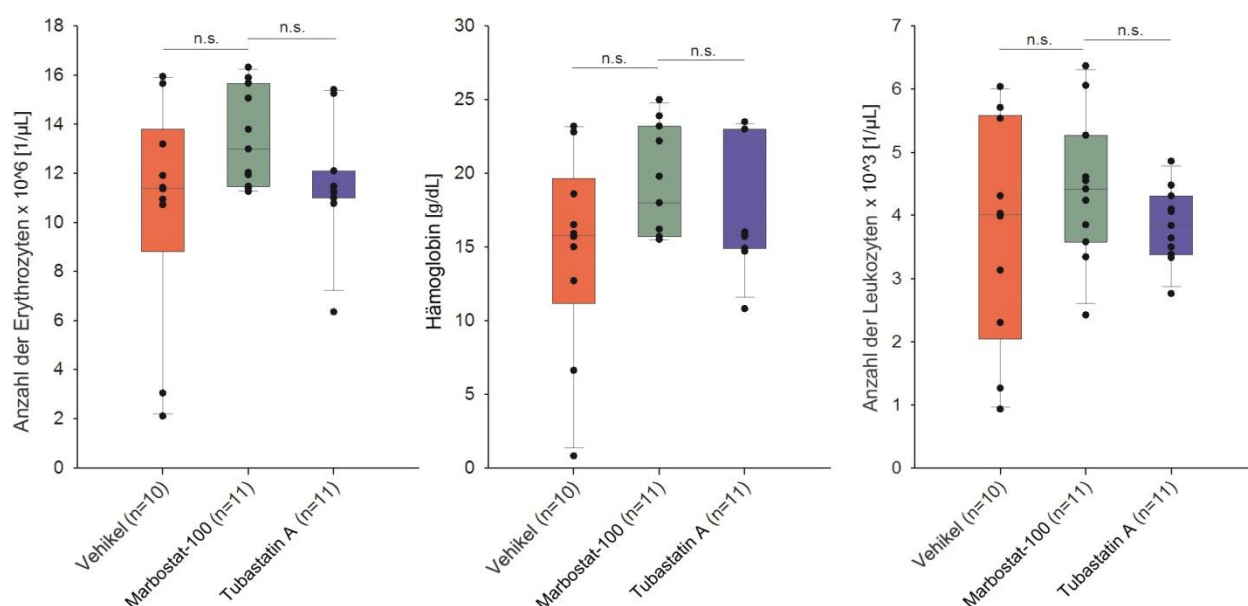
Antikörper gegen Kollagen Typ II sind im Gelenk lokalisiert und binden an intaktes autologes Kollagen. Dieses führt in weiterer Folge zur Aktivierung des Komplementsystems und setzt damit die Entzündungskaskade in Gang, welche proinflammatorische Zytokine, Chemokine und knochenabbauende Enzyme beinhaltet.<sup>292-294</sup> Um den *in vivo*-Effekt von Marbostat-100 (**13a**) auf die inflammatorischen Zytokinproduktion zu evaluieren, wurde stellvertretend die Konzentration von IL-6 mittels ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) bestimmt, da dieses Zytokin wesentlich an der Ausbildung der Synovialentzündung beteiligt ist (s. Kap. 7.2.2).



**Abb. 7.11.** Darstellung der IL-6-Konzentration nach einer Behandlung mit Marbostat-100 (**13a**) und Tubastatin A (**10**). Linke Grafik zeigt die Ergebnisse ohne Stimulierung mit ConA. Rechte Grafik zeigt das Ergebnis nach Stimulation mit ConA. Die abgebildeten Grafiken wurden von Dr. Hubert Stangl erstellt. [n.s. = nicht signifikant.]

Bei Betrachtung der **Abb. 7.11** ist kein statistisch relevanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren feststellbar. Auffallend ist, dass die unstimulierten Milzzellen kaum IL-6 produzierten (IL-6 Spiegel lag unter dem niedrigsten Standard (15,6 pg / mL)); Mit einer Concanavalin A (ConA)-Stimulation wurde jedoch jene gesteigert (Zeichen für intakte Zellen), auch wenn weiterhin kein signifikanter Unterschied zwischen

Vehikel und Behandlungsgruppen erkennbar war. ConA, ein Mitogen, wird häufig für die Stimulation von Splenozyten oder Lymphozyten herangezogen, um den maximalen Output der Zellen zu testen, da die Zytokinausschüttung für eine Messung meistens zu schwach ist.<sup>59,60</sup> Der nicht vorhandene Unterschied zwischen den einzelnen Tiergruppen ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass durch die HDAC6-Inhibition dieses Zytokin bzw. seine Hemmung eine untergeordnete Rolle in der Wirkung der HDAC6i spielt. Im Gegensatz zu anderen Ergebnissen<sup>48</sup> beeinflusste im dargestellten Versuch auch die Gabe von Tubastatin A (**10**) den IL-6 -Spiegel nicht.

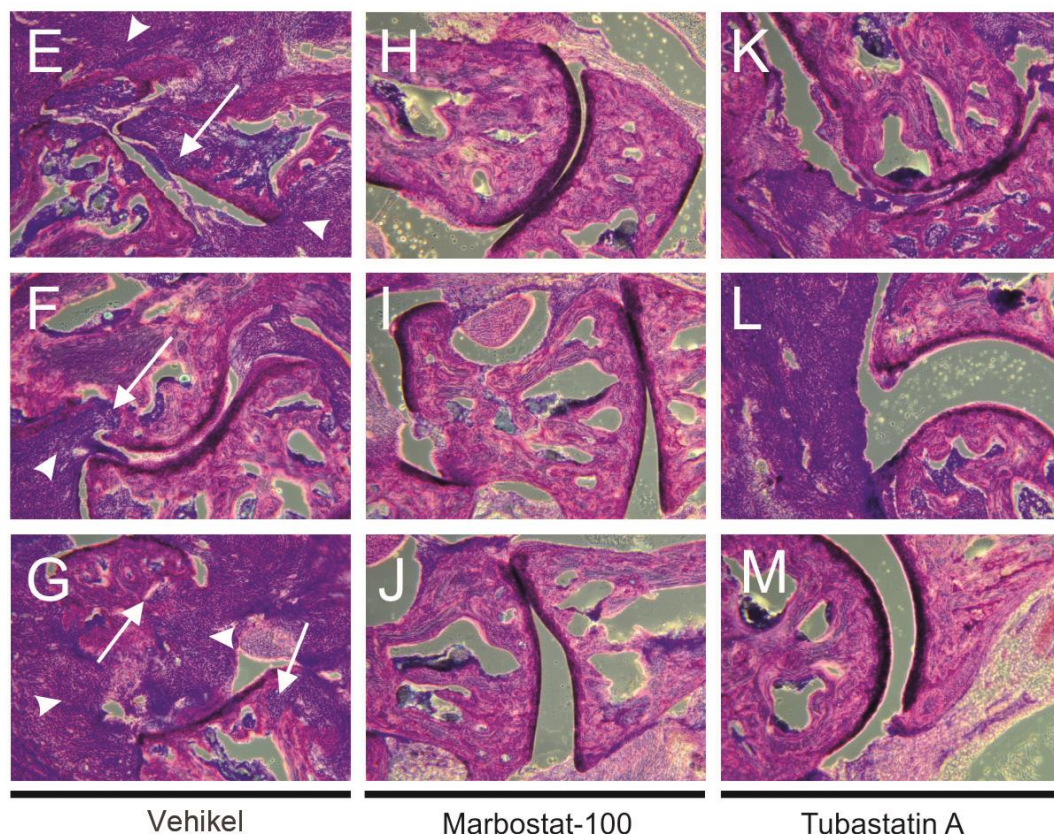


**Abb. 7.12.** Darstellung der Blutbild-Ergebnisse nach einer Behandlung mit Marbostat-100 (**13a**) und Tubastatin A (**10**). Die abgebildeten Grafiken wurden von Dr. Hubert Stangl erstellt. [n.s. = nicht signifikant.]

Um toxische Effekte *in vivo*, die von der Behandlung ausgehen könnten, ausschließen zu können, wurden die Zellzahl der Erythrozyten und Leukozyten sowie die Hämoglobinkonzentration analysiert (s. Kap. 10.7.2). Wie **Abb. 7.12** zeigt, lagen die ermittelten Blutparameterwerte aller Tiergruppen im Normbereich.

Hauptmerkmal der RA ist die Ausbildung einer chronischen Synovitis, die mit einer Hyperplasie der Synovialozyten und der Invasion von Immunzellen einhergeht, die ihrerseits zu Knochenerosionen und, ohne therapeutische Maßnahmen, zu Knochen- und Knorpeldestruktion führt (s. Kap. 7.2.2). Daher sollten die arthritischen Veränderungen im Gelenk mittels histologischen Schnitten beurteilt werden. Ausgehend von diesen Schnitten können Rückschlüsse darauf gezogen werden mit welcher Effizienz HDAC6i gegenüber

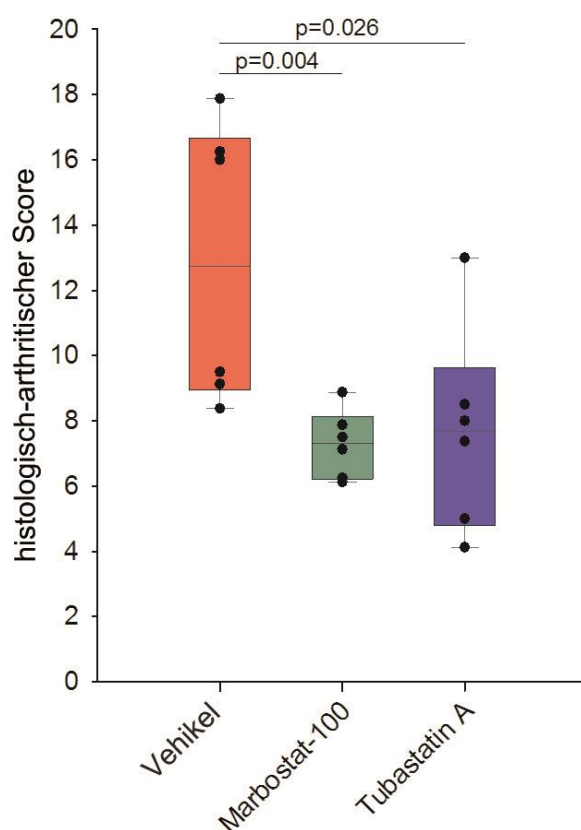
unbehandelten Tieren das Fortschreiten der Gelenkzerstörung beeinflussen. Um das histologische Erscheinungsbild hinsichtlich arthritischer Zeichen beurteilen zu können, wurden die Schnitte, die für beide Hinterpfoten pro Maus angefertigt wurden (s. Kap. 10.7.4), mittels 1,9-Dimethylmethylenblau (DMMB) angefärbt und die Scores nach den in Kap. 10.7.4 beschriebenen Kriterien verteilt. Wie dort beschrieben, waren in diesem Arthritismodell die Hinterpfoten stärker betroffen, weshalb diese auch für die histologischen Untersuchungen herangezogen wurden.



**Abb. 7.13.** Darstellung der histologischen Ergebnisse nach einer Behandlung mit Marbostat-100 (**13a**) und Tubastatin A (**10**). Diese Abb. wurde von Dr. Hubert Stangl erstellt.

**Abb. 7.13** zeigt drei repräsentative histologische Erscheinungsbilder pro getestete Tiergruppe (Vehikel, Marbostat-100 (**13a**), Tubastatin A (**10**)), die mit DMMB, einem kationischen Farbstoff, gefärbt wurden.<sup>57</sup> DMMB bindet spezifisch an sulfatierte Glukosaminglykane (sGAG), die in hohen Mengen im Gelenkknorpel exprimiert werden (durch die dunkelvioletten Färbung dargestellt).<sup>57</sup> Durch diese Färbung ist es möglich, zwischen Knochen, Knorpel und Bindegewebe zu unterscheiden und damit Knorpelschäden, Knochenabbau und Zellinfiltration sichtbar zu machen.

Beim Einsatz vom Chromotrop-Farbstoff DMMB macht man sich durch dessen Bindung an die sGAGs bedingte Veränderungen im Absorptionsspektrum zunutze, da eine Metachromasie (Farbumschlag von blau zu violett) ausgelöst wird.<sup>295</sup> Der DMMB Farbstoff wurde verwendet, da dieser gegenüber anderen kationischen Farbstoffen, wie Alcian Blau oder Toluidinblau, viel sensitiver und zuverlässiger ist.<sup>295</sup> Die histologische Auswertung der arthritischen Pfoten ergab signifikant schwächere Anzeichen in Bezug auf die Synovialentzündung, die Zellinfiltration, die Knorpeldegradierung, sowie die Knochenerosionen in Mausgelenken, die mit Marbostat-100 (**13a**,  $p = 0,004$ ) therapiert wurden im Gegensatz zu einer Tubastatin A-Therapie (**10**,  $p = 0,026$ ) (s. **Abb. 7.14**).



**Abb. 7.14.** Darstellung des histologisch-arthritischen Scores nach einer Behandlung mit Marbostat-100 (**13a**) und Tubastatin A (**10**). Die abgebildete Grafik wurde von Dr. Hubert Stangl erstellt.

Die Ergebnisse, die aus den *in vitro*-Voruntersuchungen, sowie im Rahmen der ersten *in vivo*-Mausstudie für Marbostat-100 (**13a**) erhalten wurden, zeigen, dass es sich bei dieser Verbindung um einen potenten und selektiven HDAC6i handelt, der im CIA-Modell zu einer signifikanten Reduktion des klinisch-arthritischen Scores von rund 20 % führt und bei

Betrachtung des histologisch-arthritischen Scores sogar zu einer signifikanten Reduktion von rund 50 % beiträgt (s. **Abb. 7.14** und **7.7**). Aufgrund der vorliegenden Datenlage kann zusammenfassend gesagt werden, dass **13a** im Vergleich zu **10** bessere *in vitro*-Ergebnisse in Bezug auf die HDAC6-Selektivität liefert (s. Kap. 5.2.10.1) und bei Betrachtung *in vivo* mindestens eine gleichwertige Wirkung erzielt. Aufgrund der im CIA-Modell gezeigten antiinflammatorischen Aktivität von Marbostat-100 (**13a**), wäre dessen Anwendung in der RA-Therapie, nach weiteren Untersuchungen, denkbar.

### **7.9.2 Untersuchung von *R*-Marbostat-100 (*R*-13a) und 13h zur Optimierung der therapeutischen Effizienz**

Nachdem die racemische Leitverbindung (Marbostat-100) (**13a**) gegenüber dem Tubastatin A (**10**) zur signifikanten Verbesserung führte, stand im weiteren Fokus, die therapeutische Effizienz zu verbessern. Zum einen wurden die Enantiomere von Marbostat-100 (**13a**) durch Entwicklung einer geeigneten asymmetrischen Synthese synthetisiert und zum anderen die Löslichkeit durch Einführung des 4-(2-Chloroethyl)morpholin-Substituenten verbessert (s. Kap. 3.1 und Kap. 3.7). Den Einfluss, den die Stereochemie auf die biologische Aktivität haben kann, ist spätestens seit dem Contergan-Skandal (1961 / 1962) bekannt und soll im Folgenden anhand von Beispielen verdeutlicht werden.

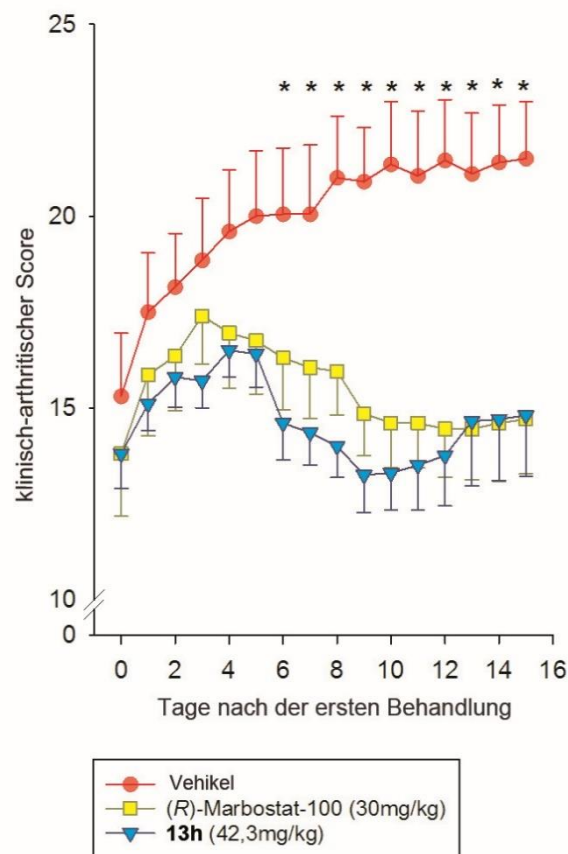
Im menschlichen Organismus liegen viele biologisch aktive Moleküle in chiraler Form vor, daher ist eine bessere Wechselwirkung zwischen Target und Therapeutikum durch Gabe eines enantiomerenreinen Arzneistoff möglich.<sup>296</sup> Bedingt durch unterschiedliche Wechselwirkungen, sind aber auch unterschiedliche Toxizitäten denkbar. In Anlehnung an die Natur, wo häufig die Biosynthesen zu ausschließlich einem oder zumindestens überwiegend einem Enantiomer führen, wird bei synthetisch hergestellten Wirkstoffen in den letzten Jahren immer häufiger darauf geachtet, gezielt eines der Enantiomere herzustellen.<sup>297</sup> Als Beispiel ist hier Ibuprofen anzuführen (unterschiedliche Pharmakokinetik der Enantiomeren), das zunächst als Racemat in den Handel kam während in den letzten Jahren dann das *S*-Enantiomer eingeführt wurde.<sup>298-300</sup> Unterschiedliche Affinitäten der beiden Enantiomere zum Rezeptor konnten beim Cetirizin gezeigt werden: Das *R*-Enantiomer (Levocetirizin) bindet 33 mal stärker an den Rezeptor als das zugehörige Diastomer.<sup>300</sup> Ob enantiomerenreine Substanzen gegenüber dem Racemat therapeutische Vorteile mit sich bringen oder nicht, muss im Einzelnen geprüft werden.<sup>301</sup>

Da im Rahmen der *in vitro*-Voruntersuchungen (s. Kap. 5.2.6) keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Enantiomeren **R-13a** und **S-13a** ersichtlich waren, wurde exemplarisch das *R*-Enantiomer im *in vivo*-Mausmodell getestet. Für die Zukunft ist auch die Testung des *S*-Enantiomers geplant.

Neben der Testung des Einflusses, den die Stereochemie mit sich bringt, wurde auch an der Löslichkeit der Leitverbindung **13a** gearbeitet, um das Applikationsspektrum zu erweitern. Da es sich bei der RA um eine chronische Erkrankung handelt, sind selbst die Antizytokin-Therapeutika (z.B. anti-TNF $\alpha$ -Antikörper), die zu einem Fortschritt in der Behandlung der RA beigetragen haben, aufgrund ihrer parenteralen Gabe eine für die Langzeitanwendung nicht zufriedenstellende Therapieform. Ähnliches wurde auch für das Tubastatin A (**10**) beschrieben, welches aufgrund seines schlechten pharmakokinetischen Profils bisher noch nicht in klinischer Anwendung ist.<sup>188</sup> Mit der Verbesserung der Wasserlöslichkeit (s. Kap. 5.2.3) ermöglicht **13h** eine orale Applikation und könnte damit zu einer besseren Patientencompliance beitragen. Um zu prüfen, welchen Einfluss die Einführung eines zusätzlichen Morpholin-Ringes in das Grundgerüst des Marbostat-100 auf die Wirkung der Substanz hat, wurde **13h** zunächst parenteral appliziert, um eine bessere Vergleichbarkeit mit Marbostat-100 (**13a**) gewährleisten zu können. Bei sofortiger oraler Applikation von **13h** und einem möglichen Ausbleiben der Wirkung, wüsste man nicht, ob dies auf die orale Gabe und damit auf den first-pass-Effekt zurückzuführen ist, oder ob eine fehlende Wirkung des Derivates die Ursache ist.

Die Dosisierungen für **R-13a** sowie für **13h** entsprachen der im ersten Versuch für das racemische Marbostat-100 (**13a**) beschriebenen Dosis und wurden im Fall von **13h** äquimolar angepasst. Die Durchführung der Immunisierung sowie der Versuchsaufbau der zweiten *in vivo*-Mausstudie im CIA-Modell erfolgten zwecks der Vergleichbarkeit in Analogie zum ersten Versuch. (s. Kap. 10.7) Im Unterschied zum ersten Versuch startete der Therapiebeginn sechs Tage später, da es länger dauerte bis alle Tiere in dem für den Therapiestart festgelegten Scorebereich (für beide Versuche identisch) lagen. Dadurch ergibt sich bei Betrachtung des klinisch-arthritischen Scores der beiden Versuche ein anderer Score-Startwert (s. **Abb. 7.7** und **Abb. 7.15**), was jedoch weder für die Abschätzung der Wirksamkeit noch für die Vergleichbarkeit ein Problem darstellt, da separat für jeden Versuch stets eine Vehikelgruppe als Vergleichsgruppe miteinbezogen wurde.



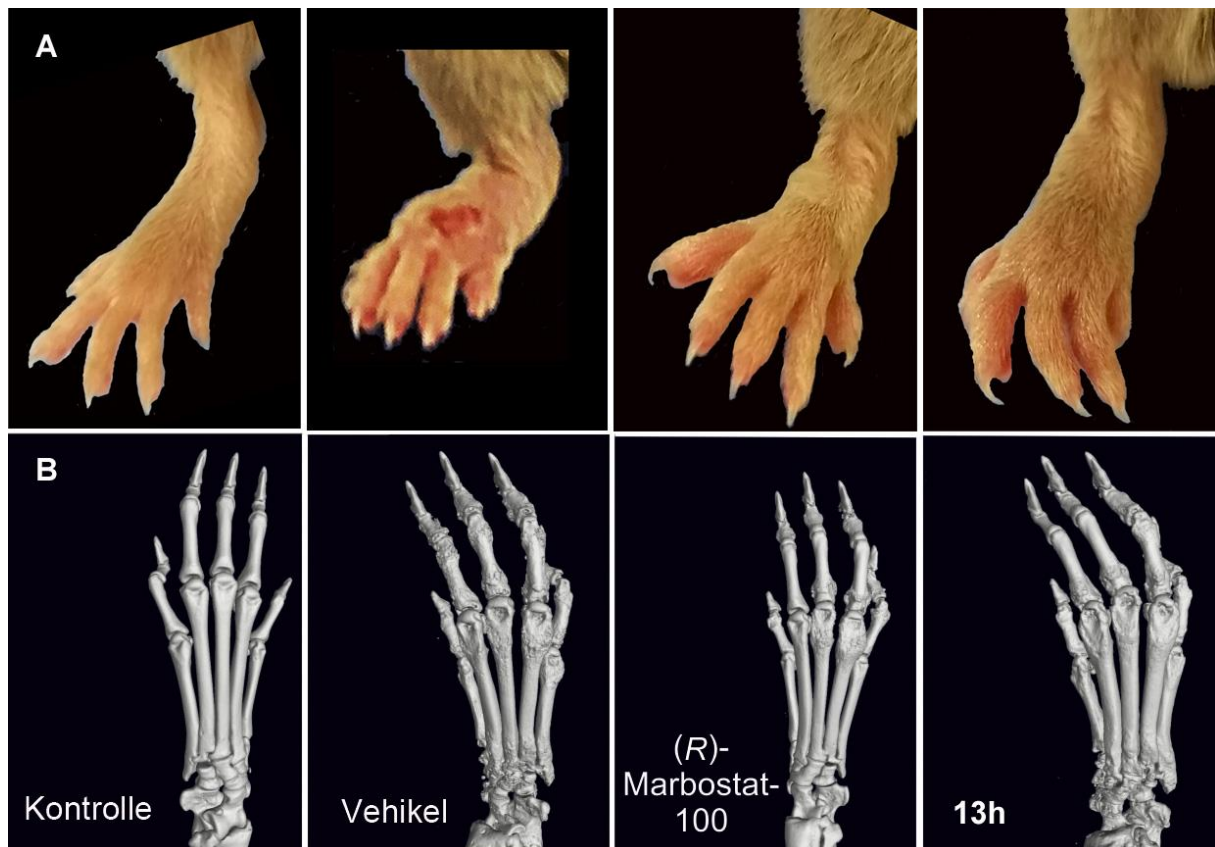


**Abb. 7.15.** Darstellung des klinisch-arthritischen Scores nach einer Behandlung mit *R*-Marbostat (**13a**) und **13h**. Die abgebildete Grafik wurde von Dr. Hubert Stangl erstellt. [\* = signifikanter Unterschied].

Ähnlich zum ersten Versuch wurde nach dem 6. Behandlungstag ein signifikant niedriger klinisch-arthritischer Score in den behandelten Gruppen beobachtet ( $p < 0,05$ , s. **Abb. 7.15**), der bis zum Versuchsende bestehen blieb. Beide Behandlungsgruppen wiesen einen ähnlichen Einfluss auf den klinisch-arthritischen Score auf und führten am Ende des Experiments zu einer Reduktion von rund 29 % (s. **Abb. 7.15**) im Vergleich zur Vehikelgruppe. Dieses Ergebnis ist somit mit der ersten *in vivo* Mausstudie vergleichbar (20 vs. 29 %).

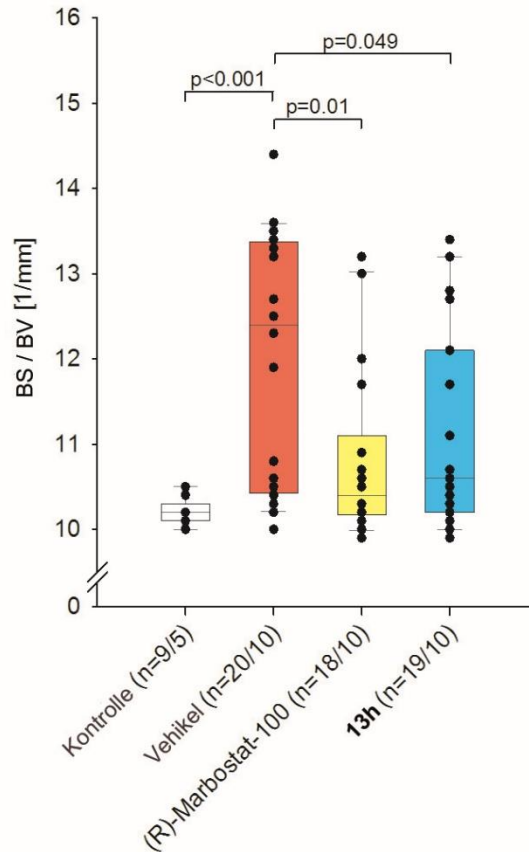
Um zusätzlich zur äußerlichen Beurteilung (s. **Abb. 7.16**) die Gelenkdestruktion quantifizieren zu können, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Birgit Striegl (Technische Hochschule (OTH), Fakultät Maschinenbau, Regensburg, Deutschland) mittels Mikrocomputertomographie ( $\mu$ CT) nicht-invasive dreidimensionale Röntgenbilder der Hinterpfoten erstellt (s. Kap. 10.7.5). Damit wurde es möglich, die interne Struktur von Gelenken mit sehr feiner Auflösung darzustellen (s. **Abb. 7.16**). Die Durchführung der Messung erfolgte dabei durch Frau Dr. Striegl. Um die Knochenerosionen in den Interphalangealgelenken der Hinterpfoten – der Bereich, der auch bei der Ermittlung des

klinisch-arthritischen Scores erfasst wurde - evaluieren zu können, wurden diese anatomischen Regionen auf einen bestimmten Bereich (*region of interest, ROI*, s. Kap. 10.7.5) reduziert, die es ermöglichten, relevante Informationen aus den Röntgenbildern auszulesen. Als morphometrische Parameter wurden das Knochenvolumen (*Bone Volume, BV*) und die Knochenoberfläche (*Bone Surface, BS*) in den festgelegten Abschnitten berechnet (s. Kap. 10.7.5). Die Knochenoberfläche in einem bestimmten Volumen nimmt durch Erosionen zu. Durch die Bestimmung des BS / BV-Verhältnisses (s. **Abb. 7.17**) kann das Ausmaß des Therapieerfolges ermittelt werden, da Vehikeltiere höhere BS / BV-Werte im Vergleich zu gesunden Tieren (Kontrolle) aufweisen. Im Rahmen der Untersuchungen konnte eine signifikant schwächere Zunahme der Knochenoberfläche bei den behandelten Tieren im Vergleich zum Vehikel festgestellt werden (s. **Abb. 7.17**).



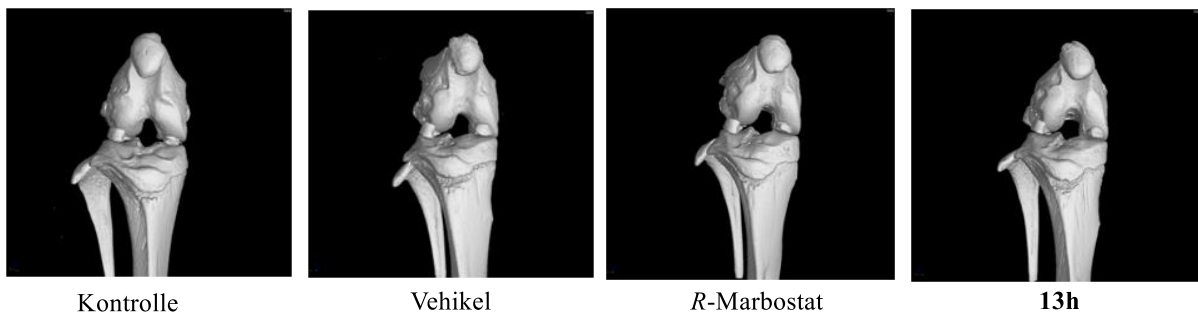
**Abb. 7.16.** Gelenkveränderungen: ein Vergleich zwischen therapiertem und krankem Tier. (A) Repräsentative Bilder der mit *R*-Marbostat (**13a**) bzw. **13h** behandelten Hinterpfoten (B) Repräsentative dreidimensionale  $\mu$ CT-Aufnahmen der Hinterpfoten. Die photographische Darstellung wird den  $\mu$ CT-Aufnahmen gegenübergestellt.





**Abb. 7.17.** Darstellung des BS / BV-Verhältnisses nach einer Behandlung mit *R*-Marbostat (**13a**) und **13h**. Die abgebildete Grafik wurde von Dr. Hubert Stangl erstellt.

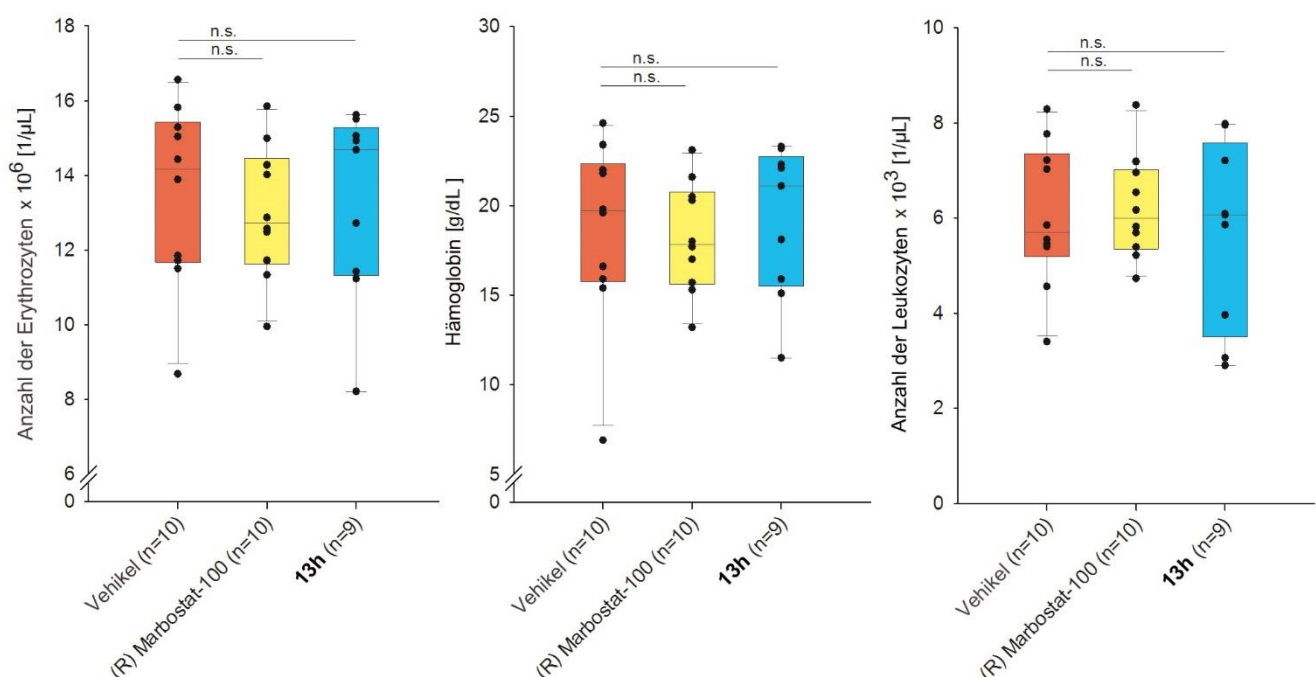
Da die histologischen Untersuchungen anhand der Hinterpfoten erfolgten, wurden zusätzlich auch noch  $\mu$ CT-Aufnahmen des Kniegelenkes gemacht, um auszuschließen, dass Bereiche ausgegrenzt wurden, die möglicherweise für die Beurteilung der Krankheitsprogression entscheidend sind. Jedoch zeigte sich im gewählten Arthritismodell, dass das Kniegelenk für eine Aussage über den therapeutischen Effekt der Behandlung nicht geeignet zu sein scheint. (s. **Abb. 7.18**).



**Abb. 7.18.** Darstellung der  $\mu$ CT-Aufnahmen des Knies nach einer Behandlung mit *R*-Marbostat (**13a**) und **13h**.

Bei der Auswertung der Erosionen im Gelenkknochen der arthritischen Hinterpfoten konnte festgestellt werden, dass im Vergleich zum Vehikel signifikant niedrigere BS / BV-Werte bei jenen Tieren erzielt werden konnten, die mit **R-13a** ( $p = 0,01$ ) oder mit **13h** ( $p = 0,049$ ) behandelt wurden (s. **Abb. 7.17**). Hinterpfoten von gleichaltrigen gesunden Mäusen dienten als Kontrolle und zeigten keine sichtbaren Erosionen (s. **Abb. 7.16**) bei der  $\mu$ CT-Messung sowie eine geringe Varianz in BS / BV-Verhältnis.<sup>57</sup> (s. **Abb. 7.17**) In allen arthritischen Gruppen (s. **Abb. 7.16**) waren sichtbare Erosionen vorhanden, allerdings waren Anzahl und Ausmaß jener in den behandelten Gruppen signifikant niedriger.<sup>57</sup>(s. **Abb. 7.16**)

Um toxische Effekte, bedingt durch Veränderungen am Grundgerüst vom Marbostat-100 (**13a**), ausschließen zu können, wurden sowohl die Hämoglobinkonzentration, als auch die Anzahl der Erythrozyten und Leukozyten bestimmt. Weder **R-13a** noch **13h** zeigten in dieser Hinsicht signifikante Veränderungen der Blutparameter im Vergleich zur Vehikelgruppe. (s. **Abb. 7.19**)



**Abb. 7.19.** Darstellung der Ergebnisse des Blutbildes nach einer Behandlung mit *R*-Marbostat (**13a**) und **13h**. Die abgebildete Grafik wurde von Dr. Hubert Stangl erstellt. [n.s. = nicht signifikant.]

## 7.10 Zusammenfassung der *in vivo*-Studie

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die protektive Wirkungen von **R-13a**, der Verbindung **13h** und des racemischen Marbostat-100 (**13a**) im arthritischen Mausmodell gezeigt werden konnten.<sup>57</sup> Dies konnte durch zusätzliche  $\mu$ CT-Messungen bestätigt werden: Die Ergebnisse der Behandlung mit **13a** zeigten bei Betrachtung des klinisch-arthritischen Scores eine signifikante Reduktion um 20 % und beim histologisch-arthritischen Score sogar um 50 %.<sup>57</sup> Zudem ließen sich für das wasserlösliche Derivat der Leitverbindung **13h** ebenfalls signifikante Effekte in Bezug auf den klinischen Score und der relativen Knochenoberfläche (BS / BV) beobachten.<sup>57</sup> Untersuchungen hinsichtlich der wesentlichen Blutparameter, wie die Anzahl der Leukozyten und Erythrozyten sowie die Gesamtmenge an Hämoglobin lagen für alle getesteten Verbindungen in den für die Maus entsprechenden Normbereichen.<sup>57</sup> Damit konnte neben der guten pharmakologischen Wirkung der Testverbindungen zudem noch ein gutes Sicherheitsprofil verzeichnet werden.<sup>57</sup>

Wie bereits in der Literatur<sup>48,302</sup> beschrieben und im Rahmen dieser Mausstudie bestätigt, ist die Anwendung selektiver HDAC6i im Bereich von rheumatischen Erkrankungen berechtigt, so dass ein Einsatz von Marbostat-100 (**13a**), aufgrund seiner überzeugenden *in vivo*-Ergebnisse, in klinischen Studien durchaus denkbar ist. Das wasserlösliche Derivat **13h** ist aufgrund seiner vergleichbaren Wirkung ein sicherlich geeigneter Wirkstoff für eine orale Applikation.

## **Kapitel 8**

### **Zusammenfassung**

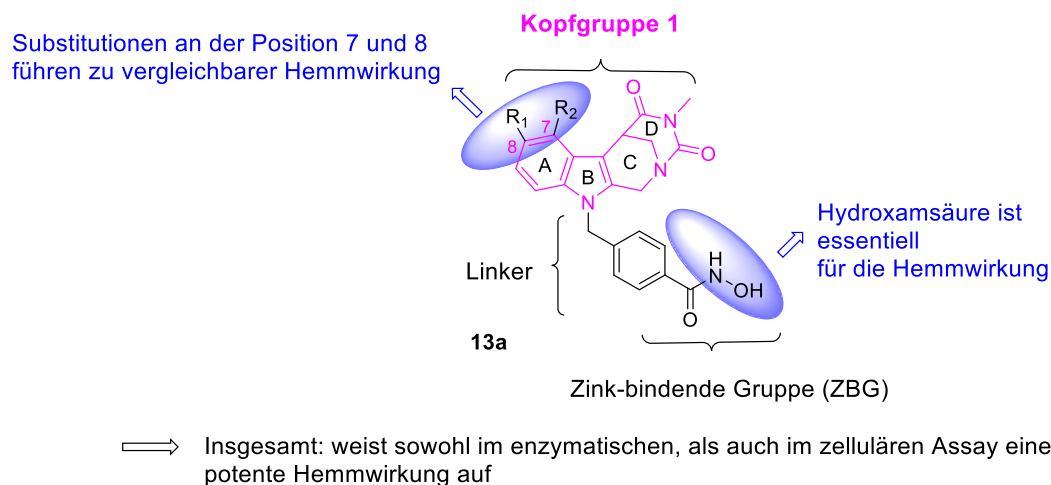
## 8 Zusammenfassung

Epigenetische Therapieansätze als vielversprechende pharmakologische Intervention zur Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen rücken zunehmend in den Fokus der modernen Arzneimittelforschung. Insbesondere selektive HDACi bieten hier interessante Möglichkeiten.

Da ferner in einem Tiermodell unter Deletion der HDAC6-Genexpression keine Beeinträchtigung der Vitalität der Versuchspopulation festgestellt werden konnte, wurde in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf Synthese und biologische Untersuchung neuer und selektiver HDAC6i gerichtet. Alle synthetisierten Verbindungen wurden hinsichtlich ihrer biologischen Wirkung am rekombinanten Enzym sowie *in vitro* getestet, um weitere Einblicke in die Struktur-Wirkungsbeziehungen gewinnen zu können. Für den Wirkstoff, der sich im Rahmen der ersten Voruntersuchungen als Leitverbindung **13a** herausgestellt hatte, wurde eine ausführliche pharmakologische Charakterisierung durchgeführt, die neben enzymatischen und zellulären Assays auch *in vivo*-Studien umfasste.

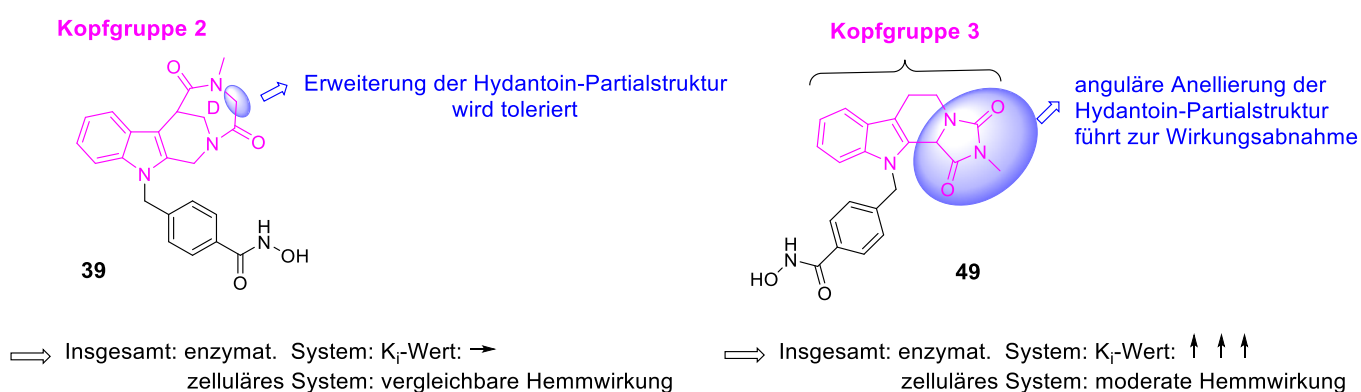
Basierend auf einem allgemeinen Modell des Pharmacophors von HDACi (s. **Abb. 8.1**), kann eine Isoenzymselektivität insbesondere durch gezielte Modifikationen der Kopfgruppe erreicht werden.

Auf Grundlage der Enzym-Inhibitionsdaten erwies sich aus der Reihe der synthetisierten Verbindungen Marbostat-100 (**13a**) (s. **Abb. 8.1**, Kopfgruppe 1) als der potenteste und selektivste HDAC6i. Ausgehend von dieser Verbindung konnten vorgenommene Modifikationen an der Grundstruktur eingeordnet und hinsichtlich ihrer Struktur-Wirkungsbeziehung beurteilt werden.



**Abb. 8.1.** Allgemeines Modell des Pharmacophors von HDACis am Beispiel der Leitverbindung Marbostat-100 (**13a**) (R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H). Modifikationen der Kopfgruppe sowie Einfluss auf die Inhibitorwirkung.

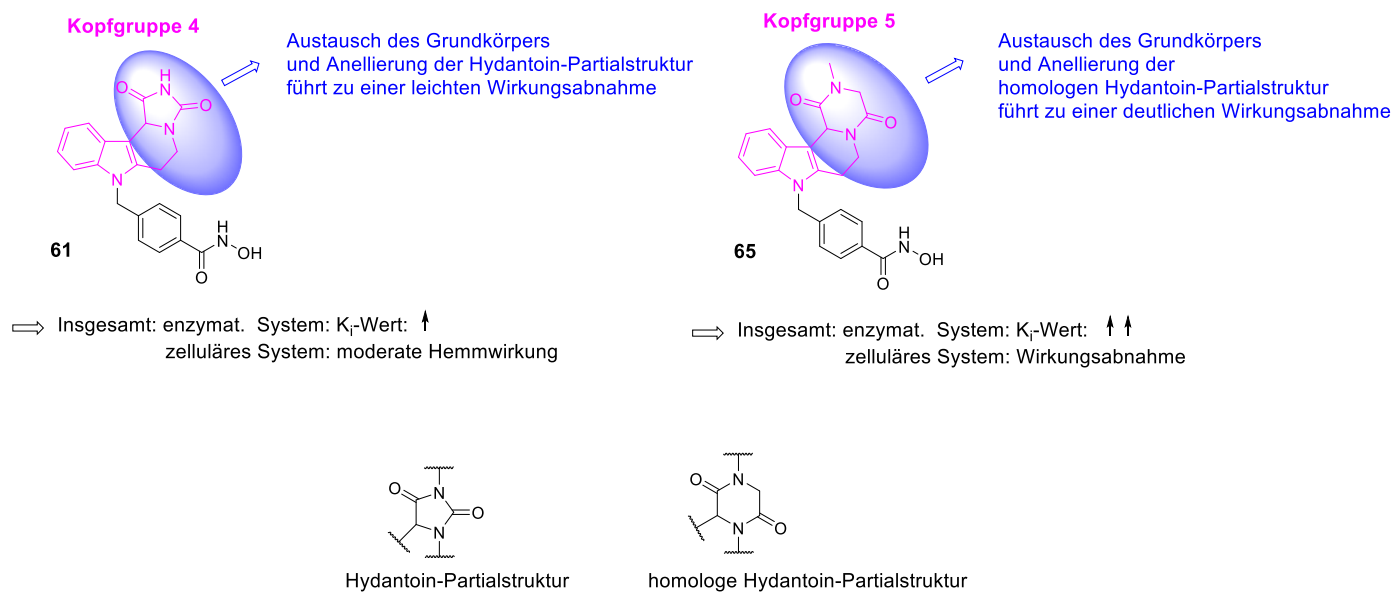
Von den synthetisierten Derivaten mit den Kopfgruppen 1-6 zeigten die Derivate mit Kopfgruppe 1 die ausgeprägtesten inhibitorischen Aktivitäten (HDAC6-K<sub>i</sub>-Wert: 0,08-0,70 nM). Diese Verbindungen führten auch im zellulären Testsystem zu sehr guten Ergebnissen. Durch die Synthese von Verbindungen mit den Kopfgruppen 2-5 sollten die Einflüsse von Modifikationen der Kopfgruppe 1 bezüglich Größe (Hydantoin-Partialstruktur vs. homologe Hydantoin-Partialstruktur; Kopfgruppe 2) und Ausrichtung (Kopfgruppe 3) des D-Ringes untersucht werden (s. **Abb. 8.2**).



**Abb. 8.2.** Einfluss der Ausrichtung und Größe des D-Ringes auf die Inhibitorwirkung in Relation zur Leitverbindung **13a**.

Dabei erwies sich die Erweiterung des D-Ringes um eine Methylengruppe als eine tolerierbare Modifikation, während die Ausrichtung des D-Ringes in Richtung der Benzylgruppe zu einem Wirkungsverlust führte. Unter Berücksichtigung dieser Informationen, welche die Testung der Inhibitoren mit den Kopfgruppen 2-3 zur Struktur-Wirkungs-Beziehung lieferte, wurden die Kopfgruppen 4-5 entwickelt (s. **Abb. 8.3**).

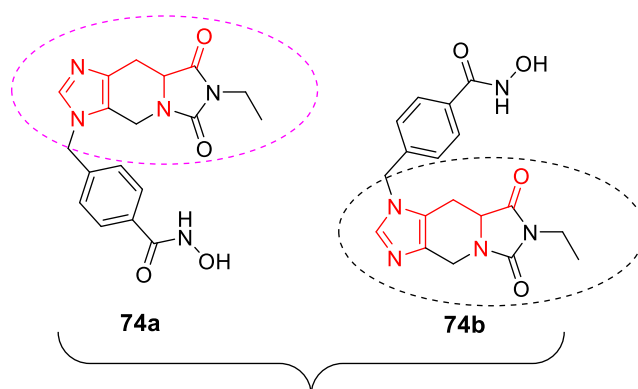
Hierbei wurde die Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-Grundstruktur durch eine Tetrahydro- $\gamma$ -carbolin-Grundstruktur ausgetauscht. Dadurch wurde eine Möglichkeit geschaffen, die inhibitorische Potenz und Selektivität der Leitverbindung **13a** (HDAC6-K<sub>i</sub>-Wert: 0,70 nM), des  $\gamma$ -Marbostat-100 (Derivate der Kopfgruppe 4-5; **61** und **65**) und des potenten und selektiven HDAC6i Tubastatin A (**10**, HDAC6-K<sub>i</sub>-Wert: 7,56 nM) zu vergleichen. Bei Tubastatin A (**10**) handelt es sich um den derzeit am häufigsten verwendeten selektiven trizyklischen HDAC6i mit einer Tetrahydro- $\gamma$ -carbolin-Grundstruktur. Dadurch konnte der Einfluss der Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-Struktur auf die biologische Aktivität der Leitverbindung **13a** eruiert werden.



**Abb. 8.3.** Einfluss des Austausches der Tetrahydro- $\beta$ -carboline-Struktur durch eine Tetrahydro- $\gamma$ -carboline-Struktur auf die Hemmwirkung in Relation zur Leitverbindung **13a**.

Die im Rahmen eines „Scaffold Hoppings“ entwickelten Derivate mit Kopfgruppe 6 (s. **Abb. 8.4**), zeigten einen deutlichen Wirkungsverlust am Target-Enzym (HDAC6- $K_i$ -Wert: 12,1-12,4 nM vs. Marbostat-100 (**13a**): HDAC6- $K_i$ -Wert: 0,70 nM).

### Kopfgruppe 6



Austausch des Grundkörpers durch eine Histidin-Substruktur  
führt zu einem Wirkungsverlust

⇒ Insgesamt: enzymat. System:  $K_i$ -Wert: ↑ ↑ ↑ ↑  
zelluläres System: keine inhibitorische HDAC6-Aktivität

**Abb. 8.4.** Einfluss des Austausches des Grundkörpers durch eine Histidin-Substruktur (in rot dargestellt) auf die Hemmwirkung in Relation zur Leitverbindung **13a**.

Zusammenfassend lassen sich folgende Feststellungen treffen:

⇒ Der Inhibitor sollte bevorzugterweise eine Tetrahydro- $\beta$ -carboline-Struktur aufweisen, um eine gute Selektivität gewährleisten zu können (Marbostat-100 (**13a**): HDAC6- $K_i$ -Wert: 0,70 nM vs.  $\gamma$ -Marbostat-100 (**61**): HDAC6- $K_i$ -Wert: 1,86 nM).

Dabei wird die Kopplung mit größeren Substituenten (Benzyloxy-, Morpholin-Reste) über einen Alkyloxy-Spacer in 8-Stellung an die Indol-Partialstruktur toleriert (siehe Derivate der Kopfgruppe 1).

⇒ Der D-Ring sollte eine Hydantoin-Partialstruktur repräsentieren, wobei eine anguläre Anellierung an die Indol-Partialstruktur zu vermeiden ist, um die gute inhibitorische Potenz gegenüber HDAC6 zu wahren (**49**: HDAC6- $K_i$ -Wert: 7,01 nM vs. Marbostat-100 (**13a**): HDAC6- $K_i$ -Wert: 0,70 nM).

⇒ Ferner konnte durch den Austausch der Hydroxamsäure gegen die Carbonsäure (**23a**) gezeigt werden, dass die Hydroxamsäure aufgrund ihrer Zink-chelatisierenden Funktion essentiell für die inhibitorische HDAC6-Aktivität ist.

Um Aussagen über den Effekt des CH-aziden Stereozentrums auf die Interaktion mit dem Target-Enzym treffen zu können, wurden die beiden Enantiomere der Leitverbindung **R-13a** und **S-13a** sowie die des wasserlöslichen Derivats **13h** synthetisiert. Der synthetische Zugang wurde über verschiedene Wege, wie die biotechnologische Synthese und die diastereomere Salzbildung versucht, und führte letztlich über mehrere Synthesestufen unter Zuhilfenahme eines chiralen Katalysators zu den gewünschten Enantiomeren mit ee-Werten von 96 bzw.



94 %. Chromatographische und  $^1\text{H}$ -NMR- spektroskopische Untersuchungen dienten der Ermittlung des Enantiomerenüberschusses.

Die Enzym-Inhibitionsdaten ergaben, dass es sich bei den jeweiligen *S*-Enantiomeren um die Eutomere handelt, wobei die eudismischen Quotienten nur bei 0,35 (**R-13a S-13a**) und 0,43 (**R-13h S-13h**) lagen und somit die nahezu vergleichbaren Ergebnisse im Rahmen der zellulären Testung stützen.

Ausgehend von den Enzym-Inhibitionsdaten für die Leitverbindung, wurde Marbostat-100 (**13a**) einer Konzentrations- und Kinetik-Studie unterzogen. Dabei konnte bereits nach 30 min Inkubationszeit bei einer Konzentration von 50 nM eine deutliche inhibitorische Aktivität nachgewiesen werden. Testungen in verschiedenen Zelllinien und der Einsatz von höheren Dosen belegten, dass es sich bei Marbostat-100 (**13a**) aufgrund der Hyperacetylierung des Surrogat-Parameters (Tubulin) bei gleichzeitiger Abwesenheit der Akkumulation des nukleären Proteins ac-H3 (Target von Klasse I HDACi) um einen selektiven Inhibitor handelt. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass für eine vergleichbare inhibitorische Potenz des Inhibitors Tubastatin A (**10**) mit Marbostat-100 (**13a**) eine 100-fach höhere Konzentration von **10** vorliegen muss (50 nM **13a** vs. 5  $\mu\text{M}$  **10**).<sup>57</sup> Demnach repräsentiert **13a** nicht nur einen selektiven, sondern auch sehr potenten HDAC6i, der in Bezug auf seine Wirkstärke dem Tubastatin A (**10**) deutlich überlegen ist. Ein Vergleich mit LBH589 (**3**), einer der potentesten und bereits von der FDA zugelassenen pan-Inhibitoren zeigte, dass **13a** im Gegensatz zu **3** bei längerer Inkubationszeit keine Destruktion des Target-Enzyms (HDAC6) verursacht.<sup>57</sup> Erst bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ist dieser Effekt auch bei Marbostat-100 (**13a**) zu beobachten. Dies kann jedoch vernachlässigt werden kann, da der Einsatz von Marbostat-100 (**13a**) in einer derartig hohen Konzentration keine pharmakologische Relevanz hat (keine weitere Zunahme von ac-Tubulin).<sup>57</sup>

Des Weiteren wurde geprüft, ob die selektive und potente Wirkung der Leitverbindung **13a** darauf zurückzuführen ist, dass durch seine Anwesenheit Zellzyklusveränderungen oder zytotoxische Effekte induziert werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte Marbostat-100 (**13a**) als ein selektiver, potenter und effizienter HDAC6i identifiziert werden, der ausschließlich posttranslationale Modifikationen am Target-Enzym bewirkt und in einem breiten Konzentrationsspektrum keinerlei zytotoxische Effekte aufweist.<sup>57</sup>

Bevor Marbostat-100 (**13a**), **R-13a** sowie das wasserlösliche Derivat der Leitverbindung **13h** abschließend in einem Arthritis-Mausmodell getestet wurden, folgte zunächst eine Metabolisierungsstudie mit **13h**. Diese zeigte, dass im Mikrosomen-Modell keine Phase I und

Phase II Metabolite nachweisbar waren, wodurch vermutet werden konnte, dass dieser Inhibitor nicht über CYP450-Enzyme in der Leber abgebaut wird. Im Rahmen einer weiteren Dissertation ist geplant, diese Beobachtung durch die Verwendung zusätzlicher *in vitro*-Metabolisierungs-Modelle zu verifizieren.

Die Untersuchungen der beiden HDAC6i im Arthritis-Mausmodell (CIA) brachten folgende Ergebnisse:

Die Behandlung mit Marbostat-100 (**13a**) (30 mg / kg) führte bereits nach einer Woche zu einer signifikanten Verbesserung des Krankheitsbildes, welche durch den reduzierten klinisch-arthritischen Score (um 25 %), die reduzierte Pfotendicke sowie den reduzierten Gewichtsverlust belegt wurde.<sup>57</sup> Dieser Therapieeffekt mit Marbostat-100 (**13a**) blieb im Fall des klinisch-arthritischen Scores sogar bis zum Ende des Versuches erhalten.

Histologische Untersuchungen der arthritischen Pfoten mit **13a** zeigten signifikant schwächere Anzeichen einer Synovia-Entzündung, eine verminderte zelluläre Invasion von Entzündungsmediatoren ins Gelenk, einen verminderten Knorpelabbau sowie eine Reduktion der Knochenerosionen ( $p = 0,004$ ). Damit konnte eine signifikante Reduktion des histologisch-arthritischen Scores um 50 % erzielt werden.<sup>57</sup>

In Rahmen einer zweiten *in vivo*-Studie wurden das wasserlösliche Derivat der Leitverbindung **13h** sowie **R-13a** in äquimolaren Konzentrationen (42,3 mg / kg bzw. 30 mg / kg) im Vergleich zur Vehikel-Gruppe getestet. Ähnlich zur ersten Studie konnte auch hierbei nach 6 Behandlungstagen ein signifikant niedrigerer klinisch-arthritischer Score verzeichnet werden ( $p < 0,05$ ). Mittels  $\mu$ CT-Messungen konnten die Erosionen in den Gelenkknochen der Hinterpfoten evaluiert werden. Das Verhältnis aus Knochenoberfläche zum Knochenvolumen (BS / BV) war signifikant niedriger ( $p = 0,049$  für **13h** und  $p = 0,01$  für **R-13a**) bei den behandelten Tiergruppen.<sup>57</sup> Röntgenaufnahmen zeigten sichtbare Erosionen in allen arthritischen Tiergruppen, wobei die Anzahl und das Ausmaß deutlich geringer für die mit den Testsubstanzen behandelten Tiergruppen ausfielen.

Zudem wurden die drei getesteten HDAC6i hinsichtlich ihres Sicherheitsprofils untersucht: Analysen der wichtigen Blutparameter, wie die Erythrozyten- und Leukozytenanzahl, sowie die Gesamtkonzentration an Hämoglobin lieferten Werte, die für alle Testsubstanzen (Marbostat-100 (**13a**), **R-13a** und **13h**) im Normbereich eines typischen Maus-Hämogramms lagen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Marbostat-100 (**13a**), **R-13a** und **13h** signifikante präklinische, histologische und radiologische Effekte ohne toxische Effekte im Arthritis-Mausmodell aufweisen.<sup>57</sup>

Die Entwicklung des wasserlöslichen Derivates der Leitverbindung **13h** diente dazu, die gute inhibitorische Aktivität und Selektivität von Marbostat-100 (**13a**) beizubehalten und die Leitverbindung **13a** dahingehend zu optimieren, dass eine biologisch aktive Verbindung entsteht, die für eine orale Wirkstoff-Applikation geeignet ist. Aus diesem Grund ist es von großem Interesse, **13h** in einer weiteren *in vivo*-Studie mit oraler Gabe zu testen. Darüber hinaus wäre es sinnvoll, die restlichen Enantiomere im Arthritis-Mausmodell zu testen, um verifizieren zu können, ob die jeweiligen *S*-Enantiomere (**S-13h**, **S-13a**) auch *in vivo* die Eutomere sind. Des Weiteren sollte basierend auf den guten biologischen Eigenschaften von Marbostat-100 (**13a**) in Betracht gezogen werden, die asymmetrische Synthese dieser Verbindung zu optimieren. Da die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Synthese bei vielen Synthesestufen basenkatalysiert ist, ist die Gefahr einer Racemisierung gegeben. Der Fokus der Optimierung sollte daher darauf gesetzt werden, durch die Einführung von Substituenten am CH-aziden Stereozentrum eine Racemisierung zu verhindern. Diese Themen sollen im Vordergrund nachfolgender Projekte stehen.

## **Kapitel 9**

### **Chemisch-experimenteller Teil**

## 9 Chemisch-experimenteller Teil

### 9.1 Allgemeine Angaben

Im Folgenden werden die Materialien und Methoden beschrieben, die zur Durchführung der in Kap. 3 dargestellten Synthesen sowie bei der Messung analytischer Daten verwendet wurden. Lösungsmittel (LM), Edukte und Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen: Acros Organics (Geel, Belgien), Abcr GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Alfa Aesar GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Carbolution Chemicals GmbH (Saarbrücken, Deutschland), Carbosynth (Berkshire, England), Fisher Scientific (Loughborough, England), Fluorochem Ltd. (Hadfield, England), Manchester Organics (Runcorn, England), Merck KGaA (Darmstadt), Sigma Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland) und TCI Europe (Zwijndrecht, Belgien).

Die kommerziell erworbenen Chemikalien entsprachen den analytischen Anforderungen (Prüfung der Identität mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie) und wurden ohne weitere Reinigung verwendet. Trockene Lösemittel, sofern dies für die Reaktion notwendig war, wurden durch Versetzen des entsprechenden Lösemittels in p.a.-Qualität mit Molekularsieb 4 Å gewonnen oder frisch destilliert. Reaktionen in absolutierten Lösungsmitteln wurden unter Stickstoff oder Argon in getrockneten Kolben (100 °C; mehrere Std) durchgeführt. Deuterierte LM für die NMR-Spektroskopie wurden von der Firma Deutero GmbH (Kastellaun, Deutschland) erworben. Zum Herstellen von Puffern, Probenlösungen, sowie als Fließmittel für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) wurde stets Reinstwasser (Astacus Membrane Pure, MembraPure GmbH, Bodenheim, Deutschland) verwendet. Alle abgebildeten chemischen Strukturen sowie deren Substanznamen wurden mit dem Programm ChemDraw Professional 15.0.0.107 (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) generiert.

Sofern nicht anders angegeben, waren alle synthetisierten Substanzen farblos.

#### NMR-Spektroskopie

Die Messungen von  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -Kernspinresonanzspektren sowie die 2D-Spektren (HMBC, HSQC, COSY und NOESY) wurden mit folgenden Geräten der Firma Bruker Biospin (Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt: Avance 300 ( $^1\text{H}$ : 300 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 75 MHz), Avance 400 ( $^1\text{H}$ : 400 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 101 MHz) oder mit einem Avance III HD 600 ( $^1\text{H}$ : 600 MHz,

$^{13}\text{C}$ : 150 MHz). Die chemische Verschiebung ist in Einheiten der  $\delta$ -Skala angegeben und bezieht sich auf  $\delta_{\text{TMS}} = 0$  ppm. Bei den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren diente als interner Standard das Resonanzsignal der Restprotonen der verwendeten Lösungsmittel [ $\delta(\text{CDCl}_3) = 7,26$  ppm,  $\delta((\text{CD}_3)_2\text{SO}) = 2,50$  ppm und  $\delta(\text{D}_2\text{O}) = 4,79$  ppm], bei den  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren das  $^{13}\text{C}$ -Resonanzsignal [ $\delta(\text{CDCl}_3) = 77,1$  ppm,  $\delta((\text{CD}_3)_2\text{SO}) = 39,5$  ppm]<sup>303</sup>. Die Multiplizität im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum wurde durch folgende Abkürzungen angegeben: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), p (Pentett/Quintett), h (Hextett/Sextett), sept (Septett), m (Multiplett), dd (Dublett vom Dublett), dt (Dublett vom Triplet), ddd (Dublett vom Dublett vom Dublett). Die Bestimmung der Multiplizität von Kohlenstoff-Atomen erfolgte durch Messung von DEPT 90- und DEPT 135- (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) Spektren. Dabei wurden die Signale folgendermaßen gekennzeichnet:

primäre und tertiäre Kohlenstoffatome → positives Signal im DEPT 135-Spektrum → “+“

sekundäre Kohlenstoffatome → negatives Signal im DEPT 135-Spektrum → “-“

quartäre Kohlenstoffatome → kein Signal im DEPT 135-Spektrum → “quart.“

Bei aromatischen AA'BB'-Spektren wurde für das entsprechende AA' bzw. BB'-System die Bezeichnung: „d, 2H, Ar-H“ verwendet (exemplarisch bei Verbindung **79a** dargestellt). Die Auswertung der  $^1\text{H}$ - bzw.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren erfolgte unter Zuhilfenahme des Programms MestReNova 10.0 (Mestrelab Research, Compostela, Spanien). Die 2D-Spektren wurden mit Hilfe des Programms TopSpin 3.1 (Bruker Corporation, Massachusetts, USA) ausgewertet. Die Strukturaufklärung der Leitverbindung Marbostat-100 (**13a**) wurde neben der routinemässigen  $^1\text{H}$ -NMR-Messung zusätzlich durch 2D-Spektren (HMBC-, HSQC-, COSY- und NOESY-Spektren) sowie durch  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren unterstützt. Dabei wurde jede einzelne Zwischenstufe charakterisiert.

Zur weiteren Struktursicherung wurde für die Derivate eine zusätzliche Messung von  $^{13}\text{C}$ -Kernspinresonanzspektren für alle literaturunbekannten Kopfgruppen, nach der Alkylierung der fertigen Kopfgruppe sowie bei allen Endstufen vorgenommen. Sofern die Verbindung als Salz der Trifluoressigsäure vorlag, wurde zur Prüfung zusätzlich ein  $^{19}\text{F}$ -NMR aufgenommen. Die Charakterisierung der Protonen bei den jeweiligen dazugehörigen chiralen Antipoden erfolgte in Analogie zu der bei der racemischen Verbindung getroffenen Zuordnung mittels 2D-Spektroskopie.

Schmelzpunkte (Smp.)

Alle angegebenen Schmelzpunkte wurden mit dem Messgerät Büchi B-545 (Flawil, Schweiz) ermittelt. Es handelt sich um unkorrigierte Werte. Für die Messung wurden Schmelzpunktkapillaren der Firma Marienfeld-Superior Laboratory Glassware (Lauda-Königshofen, Deutschland) verwendet.

#### Infrarotspektroskopie (IR)

Die Messungen wurden an einem Tensor 27 Spektrometer der Firma Bruker durchgeführt, wobei bei Feststoffen KBr als Matrix diente und für Schäume und Öle der ATR (*attenuated total reflection*)-Aufsatz verwendet wurde. Der Aufnahmebereich erstreckte sich hierbei von  $\tilde{\nu} = 4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ .

#### Elementaranalysen (CHN)

Elementaranalysen wurden von der Zentralen Analytik der Fakultät Chemie und Pharmazie (Universität Regensburg) mit dem Gerät Heraeus CHN Rapid (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) oder mit dem Gerät Heraeus Elementar Vario EL III durchgeführt. Sofern es sich bei den Verbindungen um Schäume, Öle oder Flüssigkeiten handelte, wurde an Stelle der Elementaranalyse hochauflösende Massenspektroskopie zur Bestätigung der Summenformel sowie die Reinheit mittels analytischer HPLC (mind. 95 %) herangezogen. Alle hergestellten Substanzen wurden vor der Abgabe zur Bestimmung der Elementaranalyse fein verrieben und *in vacuo* (0,5 Torr) getrocknet, um das Entfernen von Lösungsmittelresten aus der Synthese zu gewährleisten.

#### Röntgenkristallstrukturanalyse

Röntgenkristallstrukturen zur Bestimmung der absoluten Konfiguration bei der enantioselektiven Synthese wurden von der Zentralen Analytik der Fakultät Chemie und Pharmazie (Universität Regensburg, Abteilung für Röntgenstrukturanalyse) gemessen. Dort wurden auch die Röntgenstrukturdaten berechnet.

#### Massenspektrometrie (MS)

Die Messung wurde von der Zentralen Analytik der Fakultät Chemie und Pharmazie (Universität Regensburg, Abteilung für Massenspektrometrie) durchgeführt. Niedrigauflösende Massenspektren (*low-resolution mass spectra, LRMS*) wurden entweder an einem Finnigan ThermoQuest TSQ 7000 Spektrometer-Gerät (Thermo Finnigan, San Jose, USA) mit Elektrosprayionisation (ESI), gekoppelt mit einem

1100 Series HPLC-Gerät (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), oder mit einem MAT SSQ 710A (Thermo Finnigan) mit Elektronenionisation (EI) gemessen.

Die Messung hochauflösender Massenspektren (*High Resolution Mass Spectrometry, HRMS*) erfolgte an einem Agilent 6540 UHD Accurate-Mass Q-TOF LC/MS-System (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) mit Elektrosprayionisation.

### Drehwerte

Für alle chiralen Verbindungen wurde die optische Rotation an einem Anton Paar MCP 500 (Ostfildern-Scharnhausen, Deutschland) bei Raumtemperatur (20 °C) und 589 nm (Natrium-D-Linie) in einer 100 mm Küvette mit einem Durchmesser von 3 mm (Anton Paar GmbH, Ostfildern-Scharnhausen, Deutschland) gemessen. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf  $c = g / 100 \text{ mL}$ . Die Lösungsmittel, in denen die Substanzen zum Vermessen gelöst wurden, sind bei den jeweiligen Verbindungen mit angegeben.

## **9.2 Chromatographische Methoden**

### Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur Kontrolle des Reaktionsverlaufes wurde die Dünnschichtchromatographie herangezogen. Dafür wurden Kieselgel 60 F<sub>254</sub>-Platten mit Aluminium als Trägermaterial von der Firma Merck KGaA bezogen. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht (254 / 366 nm) sowie bei einigen wenigen Verbindungen durch Anfärben der DC-Platte in einer gesättigten Iodkammer.

### Säulenchromatographie (SC)

Für die Reinigung der Verbindungen wurde die Säulenchromatographie mit Geduran 60 (0,063-0,200 mm, Merck KGaA) als stationäre Phase gewählt.

### Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Vor allen HPLC-Messungen wurde eine ausreichende Begasung der Eluenten mit Helium gewährleistet. Zur Probenaufbereitung wurden die Verbindungen in dem angegebenen Eluentenverhältnis, das den Startbedingungen entspricht, gelöst. Dabei wurden ausschließlich Lösungsmittel in HPLC-Qualität verwendet: Acetonitril (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), Isopropanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), Hexan (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland), Methanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).



Nach dem Lösen wurden alle Substanzen vor den HPLC-Läufen über einen Polytetrafluorethylen-Filter (PTFE, 25 mm, 0,2 µm, Phenomenex Ltd., Aschaffenburg, Deutschland) filtriert. Die Detektion erfolgte stets bei 220 nm.

- Reinheitskontrollen mittels analytischer HPLC

wurden auf einem System der Firma Waters GmbH (Eschborn, Deutschland) mit einer Waters 1525 Binary HPLC-Pumpe, einem Waters 2707 Autosampler und einem Waters 2998 UV-Vis-Detektor ausgeführt. Als Säule wurde eine Hibar 125-4, Purospher rp 18e, 3 µm der Firma Merck KGaA verwendet, die Auswertung erfolgte mit der Software Empower 3, 2010 (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland).

Durch Bestimmung des prozentualen Anteils der Flächenpeaks bei 220 nm konnte die Reinheit der Proben bestimmt werden. Die Säulentemperatur betrug bei Verbindungen, die mit Hilfe dieses Gerätes gemessen wurden, stets 10 °C.

#### Methode A

	Zeit [min]	Flussrate [mL/min]	% A	% B
1.	—	0,80	80,0	20,0
2.	30,0	0,80	20,0	80,0
3.	31,0	0,80	5,0	95,0
4.	40,0	0,80	5,0	95,0
5.	41,0	0,80	80,0	20,0
6.	50,0	0,80	80,0	20,0

**Tab. 9.1.** Darstellung der analytischen HPLC-Methode A. Eluent A: 0,1 % Ameisensäure + H<sub>2</sub>O, Eluent B: 0,1 % Ameisensäure + Acetonitril. Das Injektionsvolumen betrug 10 [µL]. Detektion bei 220 nm.

#### Methode B

	Zeit [min]	Flussrate [mL/min]	% A	% B
1.	—	0,80	95,0	5,0
2.	30,0	0,80	20,0	80,0
3.	31,0	0,80	2,0	98,0
4.	40,0	0,80	2,0	98,0
5.	41,0	0,80	95,0	5,0
6.	50,0	0,80	95,0	5,0

**Tab. 9.2.** Darstellung der analytischen HPLC-Methode B. Eluent A: 0,1 % Ameisensäure + H<sub>2</sub>O, Eluent B: 0,1 % Ameisensäure + Acetonitril. Das Injektionsvolumen betrug 10 [µL]. Detektion bei 220 nm.

- Präparative HPLC

wurde an einem Gerät der Agilent Technologies 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) mit 1260 Pumpe, einem 1260 UV-Detektor, einem 1260 FC-PS-Autosampler und einer Eclipse XDB-C18, 5  $\mu$ m Säule der Firma Agilent Technologies (Santa Clara, USA) durchgeführt. Mit Hilfe der Software OpenLAB CDS Chemstation Edition der Firma Agilent Technologies erfolgte die Auswertung.

#### Methode A

	Zeit [min]	Flussrate [mL/min]	% A	% B
1.	30,0	3,00	20,0	80,0
2.	32,0	3,00	5,0	95,0
3.	35,0	3,00	5,0	95,0
4.	37,0	3,00	80,0	20,0
5.	40,0	3,00	80,0	20,0

**Tab. 9.3.** Darstellung der präparativen HPLC-Methode A. Eluent A: 0,1 % Ameisensäure + H<sub>2</sub>O, Eluent B: 0,1 % Ameisensäure + Acetonitril. Das Injektionsvolumen betrug 10  $\mu$ L. Detektion bei 220 nm.

#### Methode B

	Zeit [min]	Flussrate [mL/min]	% A	% B
1.	30,0	3,00	20,0	80,0
2.	32,0	3,00	2,0	98,0
3.	35,0	3,00	2,0	98,0
4.	37,0	3,00	95,0	5,0
5.	40,0	3,00	95,0	5,0

**Tab. 9.4.** Darstellung der präparativen HPLC-Methode B. Eluent A: 0,1 % Ameisensäure + H<sub>2</sub>O, Eluent B: 0,1 % Ameisensäure + Acetonitril. Das Injektionsvolumen betrug 10  $\mu$ L. Detektion bei 220 nm.

- Chirale analytische HPLC-Messungen

Da die zur Verfügung stehenden HPLC-Geräte bzw. chiralen Säulen nur mit bestimmten Lösungsmitteln genutzt werden durften, konnten nur jene synthetisierten Verbindungen hinsichtlich ihres ee-Wertes gemessen werden, die eine ausreichende Löslichkeit in den Eluentengemischen (Methanol / Isopropanol und Hexan / Isopropanol) aufwiesen. Die Fließmittelzusammensetzungen sind in Volumenprozent angegeben. Als Laufmittel dienten isokratische Gemische der oben

genannten Eluenten. Bei jedem Lauf wurde stets das racemische Gemisch mitgemessen und die UV-Spektren der Enantiomere mit dem vom Racemat geprüft. Zur Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse wurden drei verschiedene Geräte genutzt:

Die Verbindungen **R-102**, **S-102**, **R-104**, **S-104**, **R-20a**, **S-20a** sowie **(+)-82a** wurden an einem Agilent-Gerät der Serie 1100/3 (Agilent, Santa Clara, USA) mit einer GG1312A-Pumpe, einem G1315B-UV-Detektor und einer Chiracel-OD-H-Säule (250 mm x 4,6 mm) der Firma Daicel Chemical Industries Ltd. (Eschborn, Deutschland) untersucht. Die Säulentemperatur betrug stets 8 °C. Die genannten Verbindungen wurden durch Dr. Rudolf Vasold (Chromatographie-Abteilung, Fakultät der Chemie und Pharmazie, Lehrstuhl Organische Chemie Prof. Dr. König, Universität Regensburg, Deutschland) vermessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software ChemStation.

Für die im Folgenden angeführten Verbindungen wurde die HPLC-Anlage des Arbeitskreises Prof. Dr. R. Gschwind (Lehrstuhl für Organische Chemie, Universität Regensburg) verwendet: Die Verbindungen **R-108**, **S-108**, **R-110**, **S-110** wurden an einem HPLC-Gerät der Firma Agilent Technologies (Serie 1260 Infinity) mit einem G4226A-Autosampler, einer G1312B-Pumpe und einem G4212A UV-Vis-Detektor vermessen. Die Messungen wurden mit einer Daicel OD-H-Säule (4,6 x 250 mm, 5 µm) der Firma Chiral Technologies Europe (Daicel Group, Illkirch-Grattenstaden, Frankreich) durchgeführt. Für die Auswertung wurde die Software OpenLAB CDS Chemstation Edition der Firma Agilent Technologies herangezogen.

Für die angeführten Verbindungen wurde die HPLC-Anlage des Arbeitskreises Prof. Dr. J. Heilmann (Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Regensburg) verwendet: Die Verbindungen **R-26a**, **S-26a**, **R-26h**, **S-26h** wurden an einer Anlage der Firma Waters GmbH (Eschborn, Deutschland) mit einer Waters 1525 Binary HPLC-Pumpe, einem Waters 2707 Autosampler und einem Waters 2998 UV-Vis-Detektor durchgeführt. Die verwendete Säule war eine Lux Cellulose-2, 4,6 x 250 mm, 5 µm der Firma Phenomenex Ltd. (Aschaffenburg, Deutschland). Die Auswertung erfolgte mit der Software Empower 3, Version 2010 (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland).

### 9.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AV1 – 8)

Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AV1) exemplarisch am Beispiel Methyl 3-amino-2-(1*H*-indol-3-yl)propanoat hydrochlorid (**17a**) modifiziert nach Lit..<sup>59</sup>

Zu einer Lösung bestehend aus Methyl 2-(1*H*-indol-3-yl)-3-nitropropanoat (**16a**) (6,20 g, 25,0 mmol) in THF (155 mL) und MeOH (155 mL) wurden Zinkstaub (31,0 g) und CuSO<sub>4</sub> (0,62 g) als Aktivator<sup>304</sup> des Zinkstaubes gegeben. Unter starkem Rühren wurde portionsweise HCl (3 N, 310 mL) zu dem Reaktionsgemisch getropft und dieses für 2 Std bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird filtriert und der pH-Wert mit NH<sub>3conc.</sub> auf 14 eingestellt. Das Produkt wurde mit DCM (3 x 100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen getrocknet (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in THF (60 mL) gelöst und unter starkem Rühren mit HCl (6 N in Dioxan) angesäuert, um das Hydrochlorid zu gewinnen. Das Produkt wurde abfiltriert, mit THF und Diethylether gewaschen und getrocknet.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 (AV2) exemplarisch am Beispiel Methyl 2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat hydrochlorid (**18a**) modifiziert nach Lit..<sup>62</sup>

Methyl 3-amino-2-(1*H*-indol-3-yl)propanoat hydrochlorid (**17a**) (2,54 g, 10,00 mmol) und Formaldehyd (12,00 mmol, 1,06 mL 35 % in H<sub>2</sub>O) wurden in MeOH gelöst und für 1 Std auf 60 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur gekühlt und für mindestens 16 Std gerührt. Nach Zugabe von Diethylether (20,0 mL) zur vollständigen Kristallisation des Produktes wurde der Feststoff abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und getrocknet.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 (AV3) exemplarisch am Beispiel Methyl 2-(methylcarbamoyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat (**19a**) modifiziert nach Lit..<sup>64</sup>

Methyl 2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat hydrochlorid (**18a**) (0,67 g; 2,50 mmol) wurde in Acetonitril (13,4 mL) suspendiert, unter Rühren wurden Diisopropylethylamin (2,5 mL) und *N*-Succinimidyl-*N*-methyl-carbamat (0,52 g, 3,00 mmol) hinzugegeben und für 16 Std bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständiger Umsetzung des Eduktes (DC-Kontrolle) wurde der Reaktionsansatz auf H<sub>2</sub>O geschüttet und mit Ethylacetat (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 (AV4) exemplarisch am Beispiel 4-Methyl 6,11-dihydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-3,5(1*H*,4*H*)-dion (**20a**) modifiziert nach Lit..<sup>65</sup>

Zu einer Lösung bestehend aus Methyl 2-(methylcarbamoyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat (**19a**) (0,48 g; 1,67 mmol) in frisch absolutiertem Dioxan (50,0 mL) wurde unter Stickstoff Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,2 eq, 0,65 g, 2,00 mol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für mindestens 4 Std, maximal jedoch für 16 Std refluxiert. Nach vollständiger Umsetzung (DC-Kontrolle) wurde der noch warme Reaktionsansatz filtriert. Die klare Lösung wurde auf Kieselgel (5-10 mL) aufgezogen und das Lösungsmittel bei reduziertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung mit dem jeweils angegebenen Lösungsmittel lieferte das Produkt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 5 (AV5) modifiziert nach der jeweils angegebenen Lit.:

**5a**<sup>69,70</sup>: Unter Schutzgas-Atmosphäre wurde das entsprechende Tetrahydro-carbolin-Derivat (2,00 mmol) in DMF (10,0 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach der Zugabe von NaH (2,20 mmol; 60 % in Paraffin) wurde die Lösung für weitere 10 min bei der oben angegebenen Temperatur gerührt. Erst nach der Zugabe vom Alkylans (*tert*-Butyl 4-(brommethyl)benzoat) (**21**) (2,20 mmol) wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt und bis zur vollständigen Umsetzung (DC-Kontrolle) gerührt. Zum Quenchen der Reaktion wurde die Lösung auf H<sub>2</sub>O geschüttet, das Produkt entweder abfiltriert oder mit DCM extrahiert (4 x 50,0 mL). Zur Reinigung wurde in beiden Fällen eine Säulenchromatographie mit dem angegebenen Lösungsmittel durchgeführt.

**5b**<sup>69,77</sup>: Das Reaktionsgemisch bestehend aus dem entsprechenden Tetrahydro-carbolin-Derivat (2,00 mmol), wasserfreiem 2-Butanon (40,0 mL), dem Alkylans (**21**) (2,20 mmol) und K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20,0 mmol) wurde für 16 Std refluxiert. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> wurde abfiltriert, das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie gereinigt (SiO<sub>2</sub>; DCM / Ethylacetat (2:1) sofern nicht anders angegeben). Sofern erforderlich, erfolgte die Kristallisation aus DCM durch Zugabe von Petrolether.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 6 (AV6) modifiziert nach der Lit..<sup>72</sup>

Zur Spaltung der *tert*-Butoxycarbonyl-Gruppe wurde das *tert*-Butyl-carbammat-Derivat (0,50 mmol) in Trifluoressigsäure (5,0 mL) gelöst. Die Reaktionsmischung wurde für 15 min bei Raumtemperatur gerührt und nach vollständiger Umsetzung (DC-Kontrolle) auf H<sub>2</sub>O

geschüttet. Das gewünschte Produkt wurde abgesaugt und getrocknet. Sofern eine Aminogruppe in der Grundstruktur enthalten ist, wurde das Produkt als Salz der Trifluoressigsäure gewonnen, indem der Überschuss an Trifluoressigsäure unter reduziertem Druck entfernt wurde.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 7 (AV7) modifiziert nach Lit..<sup>73,74</sup>

Die Carbonsäure-Derivate (0,50 mmol) wurden in DMF (5,00 mL) gelöst und nach Zugabe von Benzotriazol-1-yloxy-tris (dimethylamin) phosphonium hexafluorophosphat (BOP) (**24**) (0,50 mmol), Triethylamin (1,50 mmol) und *O*-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)hydroxylamin<sup>305</sup> (**25**) (NH<sub>2</sub>OTHP, 2,00 mmol) bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Umsetzung (DC-Kontrolle) gerührt. Nach Zugabe von H<sub>2</sub>O wurde das Produkt, sofern es kristallisierte, abgesaugt und *in vacuo* getrocknet, anderenfalls wurde mit DCM (4 x 25,0 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit NaCl (25,0 mL) gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand *in vacuo* getrocknet. Eine weitere Reinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit dem jeweils angegebenen Lösungsmittel.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 8 (AV8) modifiziert nach Lit..<sup>306</sup>

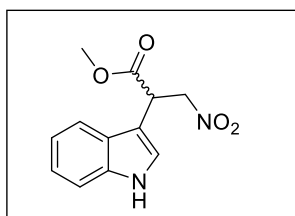
Das entsprechende Tetrahydro-carbolin-Derivat (0,30 mmol) wurde in Methanol (10,0 mL) gelöst und optional leicht erwärmt, wenn dies für das Lösen der Verbindung notwendig war. Die vorsichtige und tropfenweise Zugabe von 0,6 N HCl<sub>(aq)</sub> erfolgte bis zur leichten Trübung der Lösung. Eine weitere Zugabe von 0,6 N HCl<sub>(aq)</sub> nach 30 min führte zur Vervollständigung der Kristallisation. Der Feststoff wurde abgesaugt und über Nacht *in vacuo* getrocknet.

## 9.4 Synthese

### 9.4.1 Inhibitoren mit Kopfgruppe 1

#### Methyl 2-(1*H*-indol-3-yl)-3-nitroproanoat (**16a**)

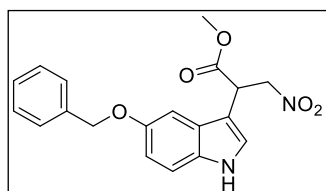
$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$  ( $M = 248,08$  g/mol)



Die Synthese wurde modifiziert nach Lit.<sup>58</sup> und erfolgte ausgehend von **15** (40,02 mmol) und Indol (**14a**) (40,03 mmol). SC (DCM) gab ein braunes Öl (6,11 g, 24,6 mmol, 61 %).  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.23 (s, 1H), 7.65 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.43 – 7.37 (m, 1H), 7.30 – 7.16 (m, 3H), 5.22 (dd,  $J = 14.3, 9.7$  Hz, 1H), 4.65 (dd,  $J = 14.3, 5.0$  Hz, 2H), 3.74 (s, 3H). Lit.<sup>62</sup>:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.74 (s, 3H), 4.61 - 4.82 (m, 2H), 5.17 - 5.29 (m, 1H), 7.12 - 7.31 (m, 3H), 7.38 - 7.42 (m, 1H), 7.66 (d, 1H,  $J = 8.42$  Hz), 8.32 (bs, 1H, NH).

#### Methyl 2-(5-(benzyloxy)-1*H*-indol-3-yl)-3-nitroproanoat (**16b**)

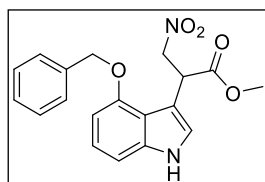
$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5$  ( $M = 354,12$  g/mol)



Die Synthese erfolgte analog Lit.<sup>58</sup> ausgehend von **15** (33,32 mmol) und 5-Benzyloxyindol (**14b**) (41,33 mmol). Nach Zugabe von basischem  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (48,00 mmol) wurde die Reaktion für 1,5 Std auf 70 °C erhitzt. SC (DCM) ergab einen Feststoff (9,01 g, 25,4 mmol, 76 %). Smp.: 32 - 34 °C. Lit.<sup>307</sup>: 31 - 35 °C.

#### Methyl 2-(4-(benzyloxy)-1*H*-indol-3-yl)-3-nitroproanoat (**16c**)

$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5$  ( $M = 354,12$  g/mol)

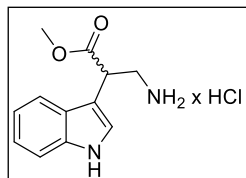


Analog zu **16b** erfolgte die Darstellung ausgehend von 4-Benzyloxyindol (**14c**) (41,33 mmol), **15** (33,32 mmol) und basischem  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (48,00 mmol). SC (DCM) gab einen Feststoff (15,00 g, 46,24 mmol, 70 %). Smp.: 93,2 °C. IR (KBr): 3418; 1737; 1584  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  11.20 (s, 1H), 7.52 - 7.47 (m, 2H), 7.42 – 7.30 (m, 3H), 7.16 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.04 – 6.96 (m, 2H), 6.60 (dd,  $J = 6.4, 2.1$  Hz, 1H), 5.76 (s, 1H), 5.20 (q,  $J = 12.5$  Hz, 2H), 5.09 – 5.04 (m, 1H), 4.91 (dd,  $J = 12.1, 3.2$  Hz, 1H), 3.56 (s, 3H).

MS ( $C_{19}H_{18}N_2O_5$ , LC-MS, ESI)  $m/z$  (%): 355 [ $MH^+$ ] (100). Anal. ( $C_{19}H_{18}N_2O_5$ ) ber.: C 64,40; H 5,12; N 7,91; gef.: C 64,40; H 5,16; N 7,78.

### Methyl 3-amino-2-(1*H*-indol-3-yl)propanoat hydrochlorid (17a)

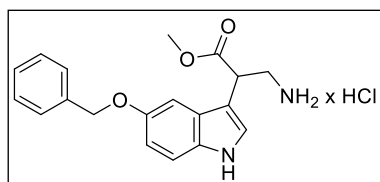
$C_{12}H_{15}ClN_2O_2$  (M = 254,08 g/mol)



Die Synthese erfolgte nach **AV1** ausgehend von Methyl 2-(1*H*-indol-3-yl)-3-nitropropanoat (**16a**) (6,20 g; 25,0 mmol). Zur Fällung als Hydrochlorid wurde der erhaltende Rückstand mit THF (60 mL) und HCl (6 N in Dioxan) versetzt. Waschen mit THF und Diethylether ergab farblose Kristalle (5,30 g, 20,8 mmol, 83 %). Smp.: 199,5 - 199,7 °C. IR (KBr): 3312; 3022; 2977; 1732  $cm^{-1}$ .  $^1H$ -NMR (300 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  7.51 – 7.38 (m, 2H), 7.27 (s, 1H), 7.18 – 7.11 (m, 1H), 7.08 – 7.02 (m, 1H), 4.29 (dd,  $J$  = 8.1, 7.0 Hz, 1H), 3.58 (s, 3H), 3.55 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 1H), 3.40 (dd,  $J$  = 13.0, 8.2 Hz, 1H). MS ( $C_{12}H_{14}N_2O_2$ , LC-MS, ESI)  $m/z$  (%): 219 [ $MH^+$ ] (100). Anal. ( $C_{12}H_{15}ClN_2O_2$ ) ber.: C 56,58; H 5,94; N 11,00; gef.: C 56,74; H 6,27; N 10,86. Lit.<sup>62</sup>:  $^1H$ -NMR ( $D_2O$ )  $\delta$  3.33 - 3.61 (m, 5H), 4.27 (t, 1H,  $J$  = 7.50 Hz), 4.65 (s, 3H), 6.99-7.17 (m, 2H), 7.26 (s, 1H), 7.37 - 7.48 (m, 1H). Aufgrund von Abweichungen der NMR-Daten zur Literatur, wurde der vollständige analytische Datensatz bestimmt.

### Methyl 3-amino-2-(5-(benzyloxy)-1*H*-indol-3-yl)propanoat hydrochlorid (17b)

$C_{19}H_{21}ClN_2O_3$  (M = 360,12 g/mol)

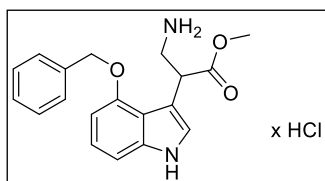


Synthese nach **AV1** ausgehend von Methyl 2-(5-(benzyloxy)-1*H*-indol-3-yl)-3-nitropropanoat (**16b**) (9,00 g, 25,4 mmol), Fällung als Hydrochlorid mit THF (80 ml) und HCl (5-6 N  $i$ Prop.) (15 ml) sowie waschen des ausgefallenen Feststoffes mit THF und Diethylether ergab farblose Kristalle (5,88 g, 18,13 mmol; 71 %). Smp.: 241,8 - 242,2 °C. IR (KBr): 3287; 2948; 1730; 1507  $cm^{-1}$ .  $^1H$ -NMR (300 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  11.21 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H), 7.99 (s, 3H), 7.50 – 7.44 (m, 2H), 7.43 – 7.36 (m, 2H), 7.35 – 7.29 (m, 1H), 7.19 (d,  $J$  = 2.5 Hz, 1H), 7.00 – 6.91 (m, 2H), 6.54 – 6.46 (m, 1H), 5.27 – 5.16 (m, 2H), 4.50 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 1H), 3.52 (s, 3H), 3.45 (dd,  $J$  = 12.7, 6.9 Hz, 1H), 3.24 (dd,  $J$  = 12.7, 7.7 Hz, 1H). MS ( $C_{19}H_{20}N_2O_3$ , LC-MS, ESI)  $m/z$  (%): 325 [ $MH^+$ ] (100). Anal. ( $C_{19}H_{21}ClN_2O_3$ ) ber.: C 63,24; H 5,87; N 7,76; gef.: C 63,28; H 6,16; N 7,39.



**Methyl 3-amino-2-(4-(benzyloxy)-1*H*-indol-3-yl)propanoat hydrochlorid (17c)**

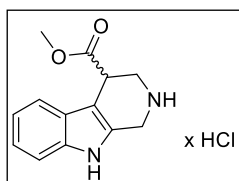
**C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (M = 360,12 g/mol)**



Synthese nach **AV1** ausgehend von Methyl 2-(4-(benzyloxy)-1*H*-indol-3-yl)-3-nitropropanoat (**16c**) (10,00 g, 28,22 mmol). Die Fällung als Hydrochlorid sowie waschen mit Diethylether, wie es bereits für **17b** beschrieben wurde, ergab farblose Kristalle (4,86 g, 14,98 mmol; 53 %). Smp.: 239,9 °C. IR (KBr): 3289; 2947; 1731; 1509 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.21 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.99 (s, 3H), 7.50 – 7.44 (m, 2H), 7.43 – 7.36 (m, 2H), 7.35 – 7.29 (m, 1H), 7.19 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.00 – 6.91 (m, 2H), 6.54 – 6.46 (m, 1H), 5.27 – 5.16 (m, 2H), 4.50 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.52 (s, 3H), 3.45 (dd, *J* = 12.7, 6.9 Hz, 1H), 3.24 (dd, *J* = 12.7, 7.7 Hz, 1H). MS (C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 325 [MH<sup>+</sup>] (100). Anal. (C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) ber.: C 63,24; H 5,87; N 7,76; gef.: C 63,09; H 5,78; N 7,54.

**Methyl 2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat hydrochlorid (18a)**

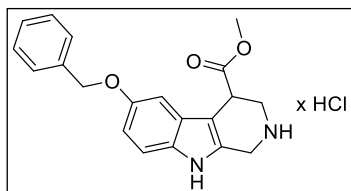
**C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M = 266,08 g/mol)**



Synthese nach **AV2** ausgehend von **17a** (1,27 g, 5,00 mmol) ergab farblose Kristalle (0,79 g, 2,96 mmol; 59 %) Das Versetzen der Mutterlage mit Diethylether (6,20 mL) steigert die Ausbeute um weitere 20 %. Smp.: 245,3 - 245,4 °C. Lit.<sup>62</sup>: Smp.: 160 - 163 °C (EtOH).

**Methyl 6-(benzyloxy)-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat hydrochlorid (18b)**

**C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (M = 372,14 g/mol)**

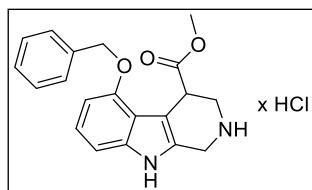


Die Synthese erfolgte nach **AV2** ausgehend von Methyl 3-amino-2-(5-(benzyloxy)-1*H*-indol-3-yl)propanoat hydrochlorid (**17b**) (5,88 g; 18,13 mmol) und ergab farblose Kristalle (5,50 g, 14,75 mmol; 81%). Smp.: 254,2 °C. IR (KBr): 3386; 2941; 1731 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.23 (s, 1H), 9.72 (s, 2H), 7.54 – 7.24 (m, 6H), 7.08 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.86 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.35 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 4.29 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 4.19 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H), 3.68 (dd, *J* = 12.1, 3.8 Hz, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.51 (dd, *J* = 12.9, 5.3 Hz, 1H). MS (C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>,

LC-MS, ESI)  $m/z$  (%): 337.15  $[MH^+]$  (100). Anal. ( $C_{20}H_{21}ClN_2O_3$ ) ber.: C 64,43; H 5,86; N 7,51; gef.: C 64,25; H 5,75; N 7,46.

**Methyl 5-(benzyloxy)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-4-carboxylat hydrochlorid (18c)**

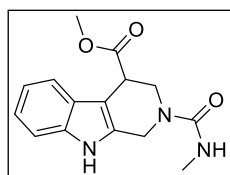
$C_{20}H_{21}ClN_2O_3$  (M = 372,14 g/mol)



Wie für **18b** beschrieben, wurde ausgehend von Methyl 3-amino-2-(4-(benzyloxy)-1H-indol-3-yl)propanoat hydrochlorid (**17c**) (6,00 g, 46,24 mmol) nach **AV2** farblose Kristalle erhalten (10,00 g, 26,82 mmol; 58 %). Smp.: 205,7 °C. IR (KBr): 3440; 3192; 1730  $cm^{-1}$ .  $^1H$ -NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  11.22 (s, 1H), 9.76 (d,  $J = 360.1$  Hz, 2H), 7.47 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.43 – 7.37 (m, 2H), 7.35 – 7.28 (m, 2H), 7.08 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 6.86 (dd,  $J = 8.8, 2.4$  Hz, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.37 – 4.26 (m, 2H), 4.19 (t,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 3.71 – 3.66 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.51 (dd,  $J = 12.9, 5.3$  Hz, 1H). MS ( $C_{20}H_{20}N_2O_3$ , LC-MS, ESI)  $m/z$  (%): 337  $[MH^+]$  (100). Anal. ( $C_{20}H_{21}ClN_2O_3$ ) ber.: C 64,43; H 5,86; N 7,51; gef.: C 64,28; H 5,80; N 7,40.

**Methyl 2-(methylcarbamoyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-4-carboxylat (19a)**

$C_{15}H_{17}N_3O_3$  (M = 287,13 g/mol)



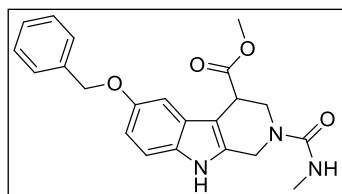
Synthese laut **AV3** ausgehend von **18a** (0,67 g, 2,50 mmol). Kristallisation aus Ethylacetat gab einen Feststoff (0,66 g, 2,30 mmol; 92 %). Smp.: 202,5 - 203,1 °C. IR (KBr): 3380; 3275; 2945; 1716  $cm^{-1}$ .  $^1H$ -NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  11.04 (s, 1H,  $NH$  (Indol)), 7.35 – 7.31 (m, 2H, Ar- $H$ ), 7.08 – 6.93 (m, 2H, Ar- $H$ ), 6.62 (q,  $J = 4.4$  Hz, 1H,  $NHCH_3$ ), 4.60 (d,  $J = 16.3$  Hz, 1H,  $NCH_AH_B C$ ), 4.51 (d,  $J = 16.2$  Hz, 1H,  $NCH_AH_B C$ ), 3.99 - 3.94 (m, 1H,  $NCH_AH_B CH$ ), 3.93 – 3.89 (m, 1H,  $NCH_AH_B CH$ ), 3.73 (dd,  $J = 13.0, 4.2$  Hz, 1H,  $NCH_AH_B CH$ ), 3.64 (s, 3H,  $CHCOOCH_3$ ), 2.60 (d,  $J = 4.3$  Hz, 3H,  $CONHCH_3$ ).

$^{13}C$ -NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  173.35 (quart.  $\underline{CO}$ ), 158.53 (quart.  $\underline{CO}$ ), 136.39 (quart. Ar- $\underline{C}$ ), 133.48 (quart. Ar- $\underline{C}$ ), 126.57 (quart. Ar- $\underline{C}$ ), 121.31 (+, Ar- $\underline{CH}$ ), 119.28 (+, Ar- $\underline{CH}$ ), 118.29 (+, Ar- $\underline{CH}$ ), 111.60 (+, Ar- $\underline{CH}$ ), 105.28 (quart. Ar- $\underline{C}$ ), 52.16 (+,  $CHCOOCH_3$ ), 44.56

(-,NCH<sub>2</sub>CH), 41.96 (-, NCH<sub>2</sub>C), 39.00 (+, CHCOOCH<sub>3</sub>), 27.74 (+,CONHCH<sub>3</sub>).  
 MS (C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 675 [2MH<sup>+</sup>] (100), 288 [MH<sup>+</sup>] (35).  
 Anal. (C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>) ber.: C 62,71; H 5,96; N 14,63; gef.: C 62,39; H 6,26; N 14,62.

**Methyl 6-(benzyloxy)-2-(methylcarbamoyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat (19b)**

**C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (M = 393,17 g/mol)**

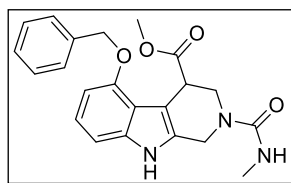


Synthese **AV3** ausgehend von Methyl 6-(benzyloxy)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat hydrochlorid (**18b**) (13,55 g, 36,59 mmol). Das Reaktionsgemisch wurde bis zur vollständigen Auskristallisation des Produktes mit H<sub>2</sub>O (1:1)

verdünnt. Farblose Kristalle (13,50 g, 34,31 mmol; 94 %). Smp.: 224,8 - 225,3 °C. IR (KBr): 3437; 3223; 1742; 1635; 1620 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.90 (s, 1H), 7.49 – 7.43 (m, 2H), 7.42 – 7.28 (m, 3H), 7.22 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.78 (dd, *J* = 8.7, 2.4 Hz, 1H), 6.62 (q, *J* = 4.0 Hz, 1H), 5.06 (s, 2H), 4.51 (q, *J* = 16.3 Hz, 2H), 3.95 (dd, *J* = 13.3, 5.6 Hz, 1H), 3.85 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H), 3.69 (dd, *J* = 13.2, 4.5 Hz, 1H), 3.59 (s, 3H), 2.59 (d, *J* = 4.2 Hz, 3H). MS (C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 394 [MH<sup>+</sup>] (100).  
 Anal. (C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) ber.: C 67,16; H 5,89; N 10,68; gef.: C 67,13; H 5,96; N 10,62.

**Methyl 5-(benzyloxy)-2-(methylcarbamoyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat (19c)**

**C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (M = 393,17 g/mol)**



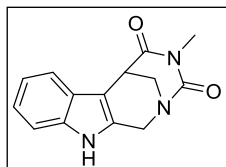
Die Synthese erfolgte nach **AV3** ausgehend von Methyl 5-(benzyloxy)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat hydrochlorid (**18c**) (10,00 g, 26,82 mmol). Die farblosen Kristalle, die durch Schütten auf H<sub>2</sub>O erhalten wurden, wurden

anschließend mit Ether gewaschen (8,44 g, 21,45 mmol; 80 %). Smp.: 257,6 °C. IR (KBr): 3438; 3224; 1715; 1620; 1571 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.00 (s, 1H), 7.45 – 7.31 (m, 5H), 6.92 (d, *J* = 3.9 Hz, 2H), 6.61 (q, *J* = 4.0 Hz, 1H), 6.54 – 6.47 (m, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.66 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 4.35 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 4.09 (dd, *J* = 13.4, 4.1 Hz, 1H), 3.99 (t, *J* = 4.2 Hz, 1H), 3.54 (dd, *J* = 13.4, 4.8 Hz, 1H), 3.37 (s, 3H), 2.57 (d, *J* = 4.2 Hz, 3H). MS

(C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 394.17 [MH<sup>+</sup>] (100). Anal. (C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) ber.: C 67,16; H 5,89; N 10,68; gef.: C 66,77; H 5,88; N 10,49.

#### 4-Methyl-6,11-dihydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-3,5(1*H*,4*H*)-dion (20a)

C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (M = 255,10 g/mol)

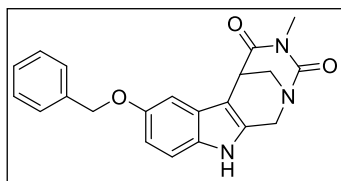


Synthese laut **AV4** ergab nach SC (DCM / Ethylacetat 1:1) einen Feststoff (0,31 g, 1,21 mmol; 72 %). Smp.: 248,7 - 249,0 °C. IR (KBr): 3357; 1717; 1687 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.14 (s, 1H, NH (Indol)), 7.48 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.34 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.00 - 7.11 (m, 2H, Ar-H), 4.67 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>C), 3.89 (dd, *J* = 13.1, 1.2 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.82 (s, 1H, NCH<sub>2</sub>CH), 3.44 (dd, *J* = 13.1, 2.3 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 2.89 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 173.74 (quart. CO), 161.51 (quart. CO), 136.01 (quart. Ar-C), 133.57 (quart. Ar-C), 126.24 (quart. Ar-C), 121.89 (+, Ar-CH), 119.75 (+, Ar-CH), 117.93 (+, Ar-CH), 112.04 (+, Ar-CH), 105.33 (quart. Ar-C), 50.10 (–, NCH<sub>2</sub>C), 46.97 (–, NCH<sub>2</sub>CH), 36.53 (+, NCH<sub>2</sub>CH), 27.82 (+, NCH<sub>3</sub>). MS (C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 297 [MH<sup>+</sup> + CH<sub>3</sub>CN] (100), 256 [MH<sup>+</sup>] (7). Anal. (C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) ber.: C 65,87; H 5,13; N 16,46; gef.: C 65,69; H 5,28; N 16,32.

#### 8-(Benzyloxy)-4-methyl-6,11-dihydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-3,5(1*H*,4*H*)-dion (20b)

C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (M = 361,14 g/mol)



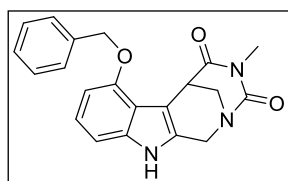
Synthese laut **AV4** ausgehend von Methyl 6-(benzyloxy)-2-(methylcarbamoyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat (**19b**) (9,95 g, 25,29 mmol). SC (Ethylacetat) ergab einen Feststoff (7,12 g, 19,7 mmol; 78 %). Smp.: 224,1 - 224,3 °C. IR (KBr): 3273; 1728; 1668 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.14 (s, 1H, NH (Indol)), 7.75 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.43 - 7.37 (m, 2H, Ar-H), 7.33 - 7.27 (m, 1H, Ar-H), 6.98 - 6.90 (m, 2H, Ar-H), 6.57 (dd, *J* = 7.0, 1.5 Hz, 1H, Ar-H), 5.25 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H, OCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>Ar), 5.19 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H, OCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>Ar), 4.67 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.60 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.09 (s, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.86 (d,

$J = 12.2$  Hz, 1H,  $\text{NCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{CH}$ ), 3.43 (dd,  $J = 13.2, 2.2$  Hz, 1H,  $\text{NCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{CH}$ ), 2.92 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  173.76 (quart.  $\text{CO}$ ), 161.60 (quart.  $\text{CO}$ ), 152.57 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 138.18 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 137.39 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 131.89 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 128.68 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 127.81 (+, (Ar- $\text{CH}$ ) $_2$ ), 127.74 (+, (Ar- $\text{CH}$ ) $_2$ ), 122.53 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 116.50 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 105.36 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 104.72 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 101.55 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 69.47 (-,  $\text{OCH}_2\text{Ar}$ ), 49.94 (-,  $\text{NCH}_2\text{C}$ ), 47.39 (-,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ), 36.93 (+,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ), 27.90 (+,  $\text{NCH}_3$ ). MS ( $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$ , LC-MS, ESI)  $m/z$  (%): 362.15  $[\text{MH}]^+$  (100). Anal. ( $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$ ) ber.: C 69,79; H 5,30; N 11,63; gef.: C 69,64; H 5,36; N 11,48.

### 7-(Benzyloxy)-4-methyl-6,11-dihydro-2,6-methano[1.3]diazocino[5,6-*b*]indol-3.5(1*H*.4*H*)-dion (20c)

$\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$  (M = 361,14 g/mol)



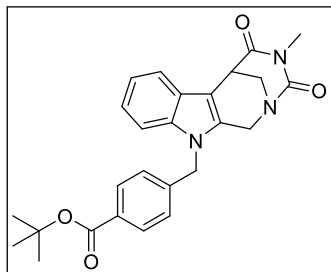
Die Darstellung erfolgte gemäß **AV4** aus Methyl 5-(benzyloxy)-2-(methoxycarbonyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido [3,4-*b*]indol-4-carboxylat (**19c**) (8,44 g, 21,45 mmol).

Nach SC (DCM / MeOH 10:1) resultierte ein Feststoff (3,50 g, 9,68 mmol; 45 %). Smp.: 259,05 - 261,9 °C. IR (KBr): 3298; 1729; 1665  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  11.13 (s, 1H,  $\text{NH}$  (Indol)), 7.74 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H, Ar- $\text{H}$ ), 7.43 – 7.34 (m, 2H, Ar- $\text{H}$ ), 7.34 – 7.23 (m, 1H, Ar- $\text{H}$ ), 6.97 – 6.87 (m, 2H, Ar- $\text{H}$ ), 6.60 – 6.52 (m, 1H, Ar- $\text{H}$ ), 5.24 (d,  $J = 12.7$  Hz, 1H,  $\text{OCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{Ar}$ ), 5.18 (d,  $J = 12.7$  Hz, 1H,  $\text{OCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{Ar}$ ), 4.66 (d,  $J = 16.3$  Hz, 1H,  $\text{NCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{C}$ ), 4.58 (d,  $J = 16.3$  Hz, 1H,  $\text{NCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{C}$ ), 4.08 (s, 1H,  $\text{NCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{CH}$ ), 3.84 (d,  $J = 12.5$  Hz, 1H,  $\text{NCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{CH}$ ), 3.42 (dd,  $J = 13.2, 2.1$  Hz, 1H,  $\text{NCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{CH}$ ), 2.91 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  173.76 (quart.  $\text{CO}$ ), 161.60 (quart.  $\text{CO}$ ), 152.57 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 138.18 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 137.39 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 131.89 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 128.68 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 127.81 (+, (Ar- $\text{CH}$ ) $_2$ ), 127.74 (+, (Ar- $\text{CH}$ ) $_2$ ), 122.53 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 116.50 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 105.36 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 104.72 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 101.56 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 69.47 (-,  $\text{OCH}_2\text{Ar}$ ), 49.94 (-,  $\text{NCH}_2\text{C}$ ), 47.39 (-,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ), 36.93 (+,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ), 27.90 (+,  $\text{NCH}_3$ ). HRMS ( $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$ , ESI-MS)  $m/z$  ber.: 384,1399  $[\text{MNa}]^+$ , gef.: 384,1399  $[\text{MNa}]^+$ . Anal. ( $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$ ) ber.: C 69,79; H 5,30; N 11,63; gef.: C 69,59; H 5,41; N 11,49.

***tert*-Butyl 4-((4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(*1H*)-yl)methyl)benzoat (22a)**

**C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (M = 445,20 g/mol)**



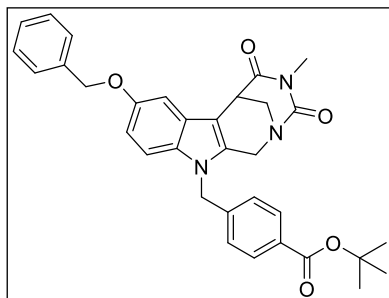
Die Darstellung erfolgte nach **AV5a** ausgehend vom 4-Methyl-6,11-dihydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-3,5(*1H,4H*)-dion (**20a**) (0,51 g, 2,00 mmol) und *tert*-Butyl 4-(bromomethyl)benzoat (**21**). Kristallisation aus DCM / *n*-Heptan ergab farblose Kristalle (0,65 g, 1,46 mmol; 73 %). Smp.:

191,5 - 191,9 °C. IR (KBr): 1714; 1687 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.82 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.53 (dd, *J* = 6.3, 2.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.41 (dd, *J* = 6.5, 2.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.16 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.12 – 7.04 (m, 2H, Ar-H), 5.45 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar (Benzyl)), 4.83 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.54 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 3.94 - 3.84 (m, 2H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.45 (dd, *J* = 13.5, 2.5 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 2.89 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.51 (s, 9H, OC (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)).

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 173.01 (quart. CO), 164.42 (quart. CO), 160.74 (quart. Ar-CO), 142.54 (quart. Ar-C), 135.85 (quart. Ar-C), 134.16 (quart. Ar-C), 130.30 (quart. Ar-C), 129.32 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 126.68 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 125.59 (quart. Ar-C), 121.71 (+, Ar-CH), 119.75 (+, Ar-CH), 117.75 (+, Ar-CH), 110.18 (+, Ar-CH), 105.33 (quart. Ar-C), 80.59 (quart. OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 48.79 (-, NCH<sub>2</sub>CH), 46.11 (-, NCH<sub>2</sub>Ar (Benzyl)), 45.87 (-, NCH<sub>2</sub>C), 35.88 (+, NCH<sub>2</sub>CH), 27.62 (+, (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.32 (+, NCH<sub>3</sub>). MS (C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, LC-MS,ESI) *m/z* (%) : 390 [MH<sup>+</sup>-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>] (100), 446 [MH<sup>+</sup>] (12,93), 463 [MNH<sub>4</sub><sup>+</sup>] (34,02). Anal. (C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) ber.: C 70,09; H 6,11; N 9,43; gef.: C 70,04; H 6,17; N 9,35.

***tert*-Butyl 4-((8-(benzyloxy)-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(*1H*)-yl)methyl)benzoat (22b)**

**C<sub>33</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (M = 551,24 g/mol)**



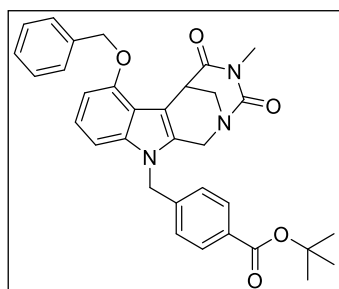
Die Synthese erfolgte nach **AV5a** ausgehend vom 8-(Benzyl-oxy)-4-methyl-6,11-dihydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-3,5(*1H,4H*)-dion (**20b**) (7,12 g, 19,70 mmol) und *tert*-Butyl 4-(bromomethyl)benzoat (**21**). SC (DCM / Ethylacetat (9:1)) ergab einen Feststoff (12,4 g, 22,48 mmol; 88 %).

Smp.: 239,4 °C. IR (KBr): 3442; 1725; 1698; 1682 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.91 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.72 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar-H), 7.46 – 7.39 (m, 2H, Ar-H), 7.36 – 7.30 (m, 1H, Ar-H), 7.08 – 7.00 (m, 3H, Ar-H), 6.82 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar-H), 6.61 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 5.38 – 5.25 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar), 5.22 (d, *J* = 17.1 Hz, 1H, OCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>Ar), 5.10 (d, *J* = 17.0 Hz, 1H, OCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>Ar), 4.86 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.32 (s, 1H, NCH<sub>2</sub>CH), 4.22 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 3.84 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.29 (dd, *J* = 12.3, 2.2 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.09 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.57 (s, 9H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 173.15 (quart. CO), 165.21 (quart. CO), 161.55 (quart. CO), 153.24 (quart. Ar-C), 141.05 (quart. Ar-C), 138.09 (quart. Ar-C), 137.46 (quart. Ar-C), 131.73 (quart. Ar-C), 131.59 (quart. Ar-C), 130.18 (+, Ar-CH), 128.46 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 127.67 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 127.53 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 126.09 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 123.30 (, Ar-CH), 116.42 (quart. Ar-C), 106.13 (quart. Ar-C), 102.77 (+, Ar-CH), 102.07 (+, Ar-CH), 81.22 (quart. OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 70.22 (-, NCH<sub>2</sub>Ar), 49.27 (-, NCH<sub>2</sub>C), 47.77 (-, NCH<sub>2</sub>CH), 47.10 (-, OCH<sub>2</sub>Ar), 36.90 (+, NCH<sub>2</sub>CH), 28.17 (+, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.96 (+, NCH<sub>3</sub>). MS (C<sub>33</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 496.19 [MH<sup>+</sup>-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>] (100), 552.25 [MH<sup>+</sup>] (38.95), 569.28 [MMH<sub>4</sub><sup>+</sup>] (31.5), 1125.48 [2MNa<sup>+</sup>] (15.21). Anal. (C<sub>33</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>) ber.: C 71,85; H 6,03; N 7,62; gef.: C 71,49; H 5,99; N 7,50.

***tert*-Butyl 4-((7-(benzyloxy)-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoat (22c)**

C<sub>33</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (M = 551,24 g/mol)



Die Synthese wurde entsprechend **AV5a** mit 7-(Benzyloxy)-4-methyl-6,11-dihydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-3,5(1*H*,4*H*)-dion (**20c**) (1,00 g, 2,77 mmol) und *tert*-Butyl 4-(brommethyl)benzoat (**21**) durchgeführt. SC (DCM / Ethylacetat (9:1)) und Kristallisation (Ethylacetat) ergaben einen Feststoff (0,75 g, 1,36 mmol; 49 %). Smp.:

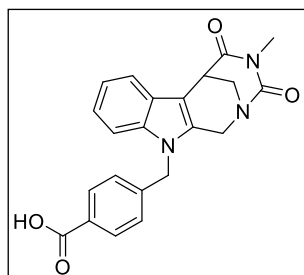
233,4 - 235,5 °C. IR (KBr): 3442; 1731; 1715; 1689 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.91 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.72 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar-H), 7.45 – 7.38 (m, 2H, Ar-H), 7.37 – 7.30 (m, 1H, Ar-H), 7.07 – 7.01 (m, 3H, Ar-H), 6.82 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar-H), 6.61 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 5.36 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>Ar), 5.30 (d, 1H, OCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>Ar), 5.22 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>Ar), 5.10 (d, *J* = 17.0 Hz, 1H, OCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>Ar), 4.86 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.32 (s, 1H, NCH<sub>2</sub>CH), 4.22 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 3.84

(d,  $J = 12.3$  Hz, 1H,  $\text{NCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{CH}$ ), 3.29 (dd,  $J = 13.2, 2.2$  Hz, 1H,  $\text{NCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{CH}$ ), 3.09 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 1.57 (s, 9H,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  173.15 (quart.  $\text{CO}$ ), 165.21 (quart.  $\text{CO}$ ), 161.55 (quart.  $\text{CO}$ ), 153.24 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 141.05 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 138.09 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 137.46 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 131.73 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 131.59 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 130.17 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 128.46 (+, (Ar- $\text{CH}$ ) $_2$ ), 127.67 (+, (Ar- $\text{CH}$ ) $_2$ ), 127.53 (+, (Ar- $\text{CH}$ ) $_2$ ), 126.09 (+, (Ar- $\text{CH}$ ) $_2$ ), 123.30 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 116.42 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 106.13 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 102.77 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 102.07 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 81.23 (quart.  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 70.22 (-,  $\text{NCH}_2\text{Ar}$ ), 49.27 (-,  $\text{NCH}_2\text{C}$ ), 47.77 (-,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ), 47.10 (-,  $\text{OCH}_2\text{Ar}$ ), 36.90 (+,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ), 28.17 (+,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 27.96 (+,  $\text{NCH}_3$ ). MS ( $\text{C}_{33}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_5$ , LC-MS, ESI)  $m/z$  (%): 552 [ $\text{MH}^+$ ] (100). Anal. ( $\text{C}_{33}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_5$ ) ber.: C 71,85; H 6,03; N 7,62; gef.: C 71,79; H 6,12; N 7,51.

#### 4-((4-Methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoesäure (23a)

$\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$  ( $M = 389,14$  g/mol)



Die Freisetzung der Carbonsäure erfolgte nach **AV6** ausgehend von *tert*-Butyl 4-((4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoat (**22a**) (0,50 g, 1,12 mmol). Verdünnung der TFA-Lösung mit  $\text{H}_2\text{O}$  bis zur Kristallisation gab einen Feststoff (0,44 g, 1,11 mmol; 99 %).

Smp.: 285,1 - 286,0 °C. IR (KBr): 1726; 1684  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  12.92 (s, 1H,  $\text{COOH}$ ), 7.85 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, Ar- $\text{H}$ ), 7.54 – 7.50 (m, 1H, Ar- $\text{H}$ ), 7.42 – 7.38 (m, 1H, Ar- $\text{H}$ ), 7.15 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, Ar- $\text{H}$ ), 7.13 – 7.04 (m, 2H, Ar- $\text{H}$ ), 5.44 (s, 2H,  $\text{NCH}_2\text{Ar}$ ), 4.81 (dd,  $J = 16.6, 5.5$  Hz, 1H,  $\text{NCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{C}$ ), 4.53 (dd,  $J = 16.5, 7.8$  Hz, 1H,  $\text{NCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{C}$ ), 3.89 (d,  $J = 12.5$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ,  $\text{NCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{CH}$ ), 3.44 (dd,  $J = 11.5, 5.6$  Hz, 1H,  $\text{NCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{CH}$ ), 2.88 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ).

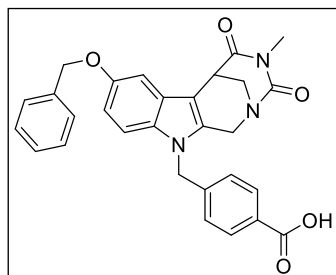
$^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  173.59 (quart.  $\text{CO}$ ), 167.44 (quart.  $\text{COOH}$ ), 161.31 (quart.  $\text{CO}$ ), 143.08 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 136.47 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 134.76 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 130.35 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 130.18 (+, (Ar- $\text{CH}$ ) $_2$ ), 127.21 (+, (Ar- $\text{CH}$ ) $_2$ ), 126.17 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 122.31 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 120.34 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 118.34 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 110.76 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 105.92 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 49.37 (-,  $\text{NCH}_2\text{C}$ ), 46.68 (-,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ), 46.50 (-,  $\text{NCH}_2\text{Ar}$ ), 36.48 (+,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ), 27.88 (+,  $\text{NCH}_3$ ).



HRMS (C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, ESI-MS)  $m/z$  ber.: 412,1268 [MNa]<sup>+</sup> gef.: 412,1271 [MNa]<sup>+</sup>. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 95,2 %,  $t_R$  = 14,8 min.

**4-((8-(Benzyloxy)-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoesäure (23b)**

C<sub>29</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (M = 495,18 g/mol)

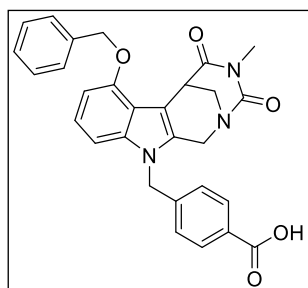


Die Freisetzung der Carbonsäure erfolgte nach **AV6** ausgehend von *tert*-Butyl 4-((8 (benzyloxy)-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoat (**22b**) (0,75 g, 1,36 mmol). Verdünnung der TFA-Lösung mit H<sub>2</sub>O bis zur Kristallisation gab einen Feststoff (0,59 g,

1,19 mmol; 88 %). Smp.: 188,3 °C. IR (KBr): 3432; 1727; 1701 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.95 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.75 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.45 – 7.35 (m, 2H), 7.35 – 7.26 (m, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.01 – 6.96 (m, 2H), 6.67 – 6.60 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.24 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 4.82 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 4.49 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 4.14 (s, 1H), 3.86 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 3.43 (dd, 1H), 2.93 (s, 3H). HRMS (C<sub>29</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>, ESI-MS)  $m/z$  ber.: 494,1721 [MH]<sup>+</sup>, gef.: 494,1718 [MH]<sup>+</sup>. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 95,0 %,  $t_R$  = 16,7 min.

**4-((7-(Benzyloxy)-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoesäure (23c)**

C<sub>29</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (M = 495,18 g/mol)



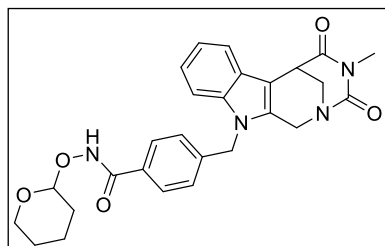
Die Freisetzung der Carbonsäure erfolgte nach **AV6** ausgehend von *tert*-Butyl 4-((7-(benzyloxy)-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoat (**22c**) (0,75 g, 1,36 mmol) und ergab einen farblosen Feststoff (0,62 g, 1,25 mmol; 92 %).

Smp.: 252,7 - 252,9 °C. IR (KBr): 3424; 1728; 1670 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.94 (s, 1H), 7.86 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.75 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.45 – 7.37 (m, 2H), 7.35 – 7.27 (m, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.01 – 6.96 (m, 2H), 6.69 – 6.59 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.24 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 4.82 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 4.49 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 4.14 (s, 1H), 3.86 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H), 3.48 – 3.39 (m, 1H), 2.93 (s, 3H). HRMS (C<sub>29</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>, ESI-MS)  $m/z$  ber.:

518,1686 [MNa]<sup>+</sup> gef.: 518,1684 [MNa]<sup>+</sup>. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 95,0 %,  $t_R$  = 16,5 min.

**4-((4-Methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(*1H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (26a)**

**C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (M = 488,21 g/mol)**



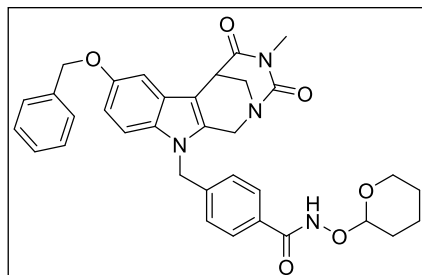
Die Darstellung erfolgte nach **AV7** ausgehend von 4-((4-Methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(*1H*)-yl)methyl) benzoessäure (**23a**) (0,45 g; 1,16 mmol). Kristallisation aus DCM durch tropfenweise Zugabe von *n*-Heptan ergab farblose Kristalle

(0,37 g, 0,76 mmol; 65 %). Smp.: 134,5 °C (zersetzt). IR (KBr): 2947; 1728; 1684 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.60 (s, 1H, CONH), 7.68 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.56 – 7.50 (m, 1H, Ar-H), 7.44 – 7.38 (m, 1H, Ar-H), 7.15 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.12 – 7.06 (m, 2H, Ar-H), 5.42 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.98 – 4.93 (m, 1H, OCHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 4.86 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.56 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.09 – 3.96 (m, 1H, OCHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.90 (d, *J* = 12.8 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.50 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, OCHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.45 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 2.89 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.76 – 1.41 (m, 6H, OCHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 173.59 (quart. CO), 161.33 (quart. CO), 141.5 (quart. CO), 136.42 (quart. Ar-C), 134.75 (quart. Ar-C), 131.9 (quart. (Ar-C)<sub>2</sub>), 128.09 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 127.13 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 126.19 (quart. Ar-C), 122.27 (+, Ar-CH), 120.32 (+, Ar-CH), 118.33 (+, Ar-CH), 110.80 (+, CH OCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 105.86 (quart. Ar-C), 101.44 (+, Ar-CH), 61.85 (-, CH<sub>2</sub>, OCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 49.42 (-, NCH<sub>2</sub>CH), 46.70 (-, NCH<sub>2</sub>Ar), 46.49 (-, NCH<sub>2</sub>C), 36.49 (+, NCH<sub>2</sub>CH), 28.33 (-, CH<sub>2</sub>, OCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 27.90 (+, NCH<sub>3</sub>), 25.17 (-, CH<sub>2</sub>, OCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 18.76 (-, CH<sub>2</sub>, OCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O). HRMS (C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>, ESI-MS) *m/z* ber.: 511,1952 [MNa]<sup>+</sup> gef.: 511,1958 [MNa]<sup>+</sup>. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 97,2 %,  $t_R$  = 16,1 min.

**4-((8-(Benzyloxy)-4-methyl-3,5-dioxo-3.4.5.6-tetrahydro-2.6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (26b)**

**C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (M = 594,25 g/mol)**

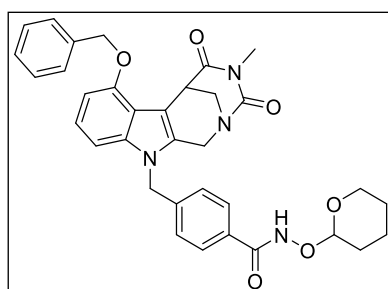


Synthese nach **AV7** ausgehend von 4-((8-(Benzyloxy)-4-methyl-3,5-dioxo-3.4.5.6-tetrahydro-2.6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoesäure (**23b**) (1,00 g, 2,02 mmol). SC (DCM / Ethylacetat (1:2)) ergab einen Feststoff (0,65 g, 1,09 mmol; 54 %). Smp.: 162,1 - 165,4 °C. IR (KBr): 3433; 1701; 1696 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.60 (s, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.48 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 7.43 – 7.29 (m, 4H), 7.13 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.10 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.83 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 5.38 (s, 2H), 5.08 (s, 2H), 4.96 (s, 1H), 4.83 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 4.53 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 4.03 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.89 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 3.83 (s, 1H), 3.44 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H), 2.90 (s, 3H), 1.75 – 1.52 (m, 6H). MS (C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 511.20 [MH<sup>+</sup> - 3,4-dihydro-2*H*-pyran] (100), 595.26 [MH<sup>+</sup>] (9.14), 617 [MNa<sup>+</sup>] (7.96).

Anal. (C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>) ber.: C 68,67; H 5,76; N 9,42, gef.: C 68,40; H 5,82; N 9,39.

**4-((7-(Benzyloxy)-4-methyl-3,5-dioxo-3.4.5.6-tetrahydro-2.6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (26c)**

**C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (M = 594,25 g/mol)**



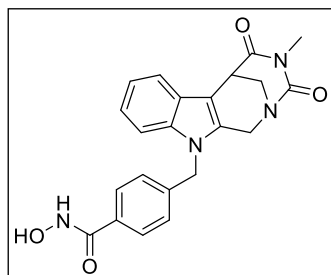
Die Synthese erfolgte nach **AV7** ausgehend von 4-((7-(Benzyloxy)-4-methyl-3,5-dioxo-3.4.5.6-tetrahydro-2.6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoesäure (**23c**) (0,59 g, 1,19 mmol). SC (DCM / MeOH (10:1) + 1 % NH<sub>3</sub>) ergab einen Feststoff (0,33 g, 0,55 mmol; 47 %). Smp.: 157,6 - 158, 2 °C. IR (KBr): 3354; 2942; 1724;

1681 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.61 (s, 1H), 7.78 – 7.72 (m, 2H), 7.71 – 7.65 (m, 2H), 7.44 – 7.36 (m, 2H), 7.34 – 7.29 (m, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.00 – 6.96 (m, 2H), 6.69 – 6.61 (m, 1H), 5.38 (s, 2H), 5.23 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 4.96 (s, 1H), 4.84 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 4.50 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 4.14 (s, 1H), 4.05 – 4.01 (m, 1H), 3.86 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H), 3.53 – 3.49 (m, 1H), 3.48 – 3.40 (m, 1H), 2.93 (s, 3H), 1.81 – 1.50 (m, 6H).

MS (C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 595 [MH<sup>+</sup>] (12,92), 511 [MH<sup>+</sup>-C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O] (100);  
 Anal. (C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>) ber.: C 68,67; H 5,76; N 9,42, gef.: C 68,25; H 5,80; N 9,36.

***N*-Hydroxy-4-((4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzamid (Marbostat-100) (13a)**

**C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (M = 404,15 g/mol)**



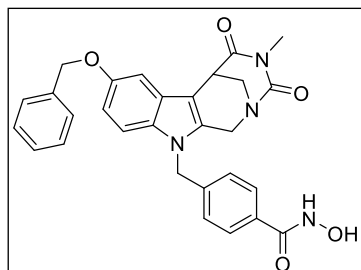
Marbostat-100 (**13a**) wurde nach **AV8** ausgehend von 4-((4-Methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (**26a**) (0,16 g, 0,33 mmol) synthetisiert. Kristallisation (DCM / *n*-Heptan) gab farblose Kristalle (0,06 g, 0,148 mmol;

46 %). Smp.: 148,0 °C. IR (KBr): 1717; 1673 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.15 (s, 1H, NHOH), 9.00 (s, 1H, NHOH), 7.65 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.53 – 7.49 (m, 1H, Ar-H), 7.42 - 7.37 (m, 1H, Ar-H), 7.12 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.10 – 7.03 (m, 2H, Ar-H), 5.39 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar (Benzyl)), 4.84 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.56 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 3.93 – 3.84 (m, 2H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.45 (dd, *J* = 12.9, 1.9 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 2.88 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 173.57 (quart. CO), 164.29 (quart. CO), 161.32 (quart. CO), 141.17 (quart. Ar-C), 136.40 (quart. Ar-C), 134.72 (quart. Ar-C), 132.37 (quart. Ar-C), 127.72 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 127.09 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 126.19 (quart. Ar-C), 122.25 (+, Ar-CH), 120.31 (+, Ar-CH), 118.32 (+, Ar-CH), 110.79 (+, Ar-CH), 105.82 (quart. Ar-C), 49.41 (–, NCH<sub>2</sub>C), 46.70 (–, NCH<sub>2</sub>CH), 46.47 (–, NCH<sub>2</sub>Ar (Benzyl)), 36.50 (+, NCH<sub>2</sub>CH), 27.89 (+, NCH<sub>3</sub>). MS (C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 405 [MH<sup>+</sup>] (100). Anal. (C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>) ber.: C 65,34; H 4,98; N 13,85; gef.: C 65,19; H 5,06; N 13,69.

**4-((8-(Benzyloxy)-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)-*N*-hydroxybenzamid (**13b**)**

**C<sub>29</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (M = 510,19 g/mol)**

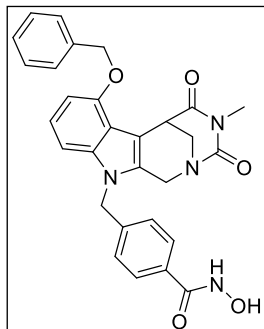


**13b** wurde nach **AV8** aus 4-((8-(Benzyloxy)-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoesäure (**26b**) (0,40 g, 0,67 mmol) synthetisiert. Kristallisation (THF / MeOH) ergab einen Feststoff (0,15 g, 0,29 mmol; 44 %). Smp.: 140,3 - 145,4 °C. IR (KBr): 1729, 1684; 1481 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.16 (s, 1H, NHOH), 9.02 (s, 1H, NHOH), 7.65 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.50 – 7.45 (m, 2H, Ar-H), 7.43 – 7.28 (m, 4H, Ar-H), 7.13 – 7.10 (m, 2H, Ar-H), 7.09 – 7.07 (m, 1H, Ar-H), 6.83 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 5.36 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar (Benzyl)), 5.13 – 5.03 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>Ar), 4.83 (d, *J* = 16.7 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.54 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 3.94 - 3.80 (m, 2H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH, Überlagerung beider Signale), 3.45 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 2.90 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 173.56 (quart. CO), 164.54 (quart. CO), 161.48 (quart. CO), 153.53 (quart. C), 141.27 (quart. C), 137.96 (quart. C), 135.34 (quart. C), 132.43 (quart. C), 131.70 (quart. C), 128.84 (+, Ar-CH), 128.17 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 128.14 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 127.71 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 127.06 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 126.66 (quart. C), 112.44 (+, Ar-CH), 111.64 (+, Ar-CH), 105.41 (quart. C), 102.02 (+, Ar-CH), 70.35 (-, OCH<sub>2</sub>Ar), 49.39 (-, NCH<sub>2</sub>CH), 46.73 (-, NCH<sub>2</sub>Ar), 46.52 (-, NCH<sub>2</sub>C), 36.50 (+, NCH<sub>2</sub>CH), 27.88 (+, NCH<sub>3</sub>). HRMS (C<sub>29</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>, ESI-MS) *m/z* ber.: 533,1795 [MNa<sup>+</sup>], gef.: 533,1792 [MNa<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 98,7 %, *t<sub>R</sub>* = 16,7 min.

**4-((7-(Benzyloxy)-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)-*N*-hydroxybenzamid (**13c**)**

**C<sub>29</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (M= 510,19 g/mol)**



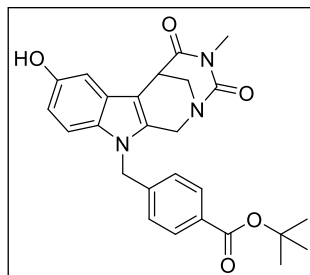
Die Endverbindung wurde nach **AV8** ausgehend von 4-((7-(Benzyloxy)-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (**26c**) (0,33 g, 0,55 mmol) synthetisiert. Kristallisation (THF / MeOH) gab einen beigen Feststoff (0,15 g, 0,30 mmol; 53 %). Smp.: 138,3 - 142,4 °C. IR (KBr): 1726; 1682;

1461 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.17 (s, 1H, NHOH), 9.02 (s, 1H, NHOH), 7.78 – 7.73 (m, 2H, Ar-H), 7.68 – 7.63 (m, 2H, Ar-H), 7.43 – 7.35 (m, 3H, Ar-H), 7.13 – 7.07 (m, 3H, Ar-H), 7.00 – 6.95 (m, 2H, Ar-H), 5.37 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar), 5.23 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>Ar), 4.85 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.51 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.14 (s, 1H, NCH<sub>2</sub>CH), 3.86 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.48 – 3.42 (m, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 2.93 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO): δ 173.57 (quart. CO), 169.44 (quart. CO), 161.33 (quart. CO), 153.53 (quart. C), 141.24 (quart. C), 137.95 (quart. C), 135.33 (quart. C), 132.32 (quart. C), 131.69 (quart. C), 128.84 (+, Ar-CH), 128.17 (+, Ar-CH), 128.14 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 127.81 (+, Ar-CH), 127.70 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 127.06 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 126.66 (quart. C), 112.44 (+, Ar-CH), 111.61 (+, Ar-CH), 105.41 (quart. C), 102.05 (+, Ar-CH), 70.35 (-, OCH<sub>2</sub>Ar), 49.45 (-, NCH<sub>2</sub>CH), 46.72 (-, NCH<sub>2</sub>Ar), 46.55 (-, NCH<sub>2</sub>C), 36.50 (+, NCH<sub>2</sub>CH), 27.87 (+, NCH<sub>3</sub>). HRMS (C<sub>29</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>, ESI-MS) *m/z* ber.: 511,1976 [MH<sup>+</sup>], gef.: 511,1973 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 100,0 %, *t<sub>R</sub>* = 17,0 min.

***tert*-Butyl 4-((8-hydroxy-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(*1H*)-yl)methyl)benzoat (**22d**)**

**C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (M = 461,20 g/mol)**

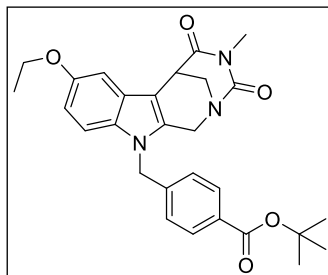


In Anlehnung an die Lit.<sup>308</sup> wurde die Verbindung *tert*-Butyl 4-((8-(benzyloxy)-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(*1H*)-yl)methyl)benzoat (**22b**) (0,52 g, 0,94 mmol) in Tetrahydrofuran (65 mL) gelöst und 0,22 g Pd / C (10 % Pd) zugegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre gerührt und der Reaktionsfortschritt mittels DC (DCM / MeOH (10:1)) überwacht. Nach vollständiger Umsetzung wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abfiltriert und das Solvens unter reduziertem Druck entfernt. Man erhielt einen Feststoff (0,42 g, 0,91 mmol; 97 %). Smp.: 201,8 - 205,9 °C. IR (KBr): 2969; 2933; 1715; 1684; 1663 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.87 (s, 1H, OH), 7.80 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.17 – 7.10 (m, 3H, Ar-H), 6.86 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 6.62 – 6.54 (m, 1H, Ar-H), 5.33 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.76 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.48 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 3.85 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.74 (s, 1H, NCH<sub>2</sub>CH), 3.40 (dd, *J* = 13.2, 2.2 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 2.88 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.50 (s, 9H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 173.66 (quart. CO), 165.09 (quart. CO), 161.36 (quart. CO), 151.98 (quart. Ar-C), 143.33 (quart. Ar-C), 134.86 (quart. Ar-C), 130.87 (quart. Ar-C), 130.85 (quart. Ar-C), 129.84 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 127.23 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 126.98 (quart. Ar-C), 112.22 (+, Ar-CH), 111.25 (+, Ar-CH), 104.88 (quart. Ar-C), 102.48 (+, Ar-CH), 81.16 (quart. OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 49.45 (-, NCH<sub>2</sub>C), 46.76 (-, NCH<sub>2</sub>CH), 46.53 (-, NCH<sub>2</sub>Ar), 36.60 (+, NCH<sub>2</sub>CH), 28.22 (+, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.87 (+, NCH<sub>3</sub>). MS (C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 406,14 [MH<sup>+</sup>-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>] (100), 462,20 [MH<sup>+</sup>] (16.77), 479,23 [MNH<sub>4</sub><sup>+</sup>] (39.69), 945,38 [MNa<sup>+</sup>] (4.89). Anal. (C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>) ber.: C 67,66; H 5,90; N 9,10; gef.: C 67,28; H 5,98; N 8,84.

***tert*-Butyl 4-((8-ethoxy-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(*1H*)-yl)methyl)benzoat (**22e**)**

**C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (M = 489,23 g/mol)**



Die Synthese nach **AV5a** ausgehend von *tert*-Butyl 4-((8-hydroxy-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(*1H*)-yl)methyl)benzoat

**(22d)** (0,10 g, 0,22 mmol) und Bromethan (**27**) (0,035 g, 0,33 mmol). SC (Ethylacetat) ergab einen Feststoff (0,05 g,

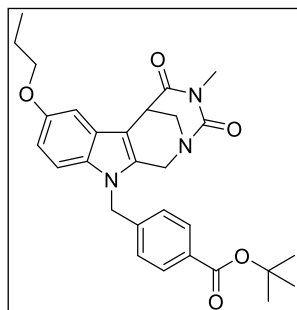
0,10 mmol; 46 %). Smp.: 233,9 - 234,7 °C. IR (KBr): 2976; 1724; 1708 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.28 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.14 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 6.97 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 6.73 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 5.39 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.80 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.51 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.05 – 3.95 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.88 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.83 (s, 1H, NCH<sub>2</sub>CH), 3.43 (dd, *J* = 13.1, 2.1 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 2.89 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.51 (s, 9H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.33 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 173.58 (quart. CO), 165.08 (quart. CO), 161.33 (quart. CO), 153.66 (quart. Ar-C), 143.21 (quart. Ar-C), 135.15 (quart. Ar-C), 131.54 (quart. Ar-C), 130.88 (quart. Ar-C), 129.87 (+, Ar-CH), 127.21 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 126.67 (quart. Ar-C), 112.42 (+, Ar-CH), 111.56 (+, Ar-CH), 105.48 (quart. Ar-C), 101.29 (+, Ar-CH), 81.17 (quart. OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 63.94 (-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 49.42 (-, NCH<sub>2</sub>C), 46.70 (-, NCH<sub>2</sub>CH), 46.57 (-, NCH<sub>2</sub>Ar), 36.47 (+, Ar-CH), 28.22 (+, OC (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.87 (+, NCH<sub>3</sub>), 15.31 (+, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). HRMS (C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>, ESI-MS) *m/z* ber.: 507,2602 [MNH<sub>4</sub><sup>+</sup>] gef.: 507,2603 [MNH<sub>4</sub><sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 98,0 %, t<sub>R</sub> = 27,1 min.



***tert*-Butyl 4-((4-methyl-3,5-dioxo-8-propoxy-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(*1H*)-yl)methyl)benzoat (**22f**)**

**C<sub>29</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (M = 503,24 g/mol)**



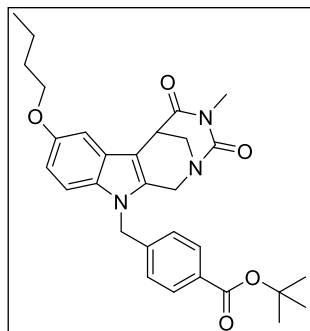
Darstellung nach **AV5a** aus *tert*-Butyl 4-((8-hydroxy-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(*1H*)-yl)methyl)benzoat (**22d**) (0,10 g, 0,22 mmol) und 1-Brompropan (**28**) (0,039 g, 0,33 mmol). Das Reaktionsgemisch wurde bis zur vollständigen Auskristallisation des Produktes mit H<sub>2</sub>O (1:1) verdünnt. (0,06 g, 0,12 mmol; 54 %). Smp.: 232,1 - 235,3 °C.

IR (KBr): 2963; 2929; 1710; 1680 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.28 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.14 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar-H), 6.97 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 6.74 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 5.39 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.80 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.51 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 3.92 – 3.88 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.87 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.83 (s, 1H, NCH<sub>2</sub>CH), 3.43 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 2.89 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.82 – 1.64 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.51 (s, 9H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.99 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 173.62 (quart. CO), 165.10 (quart. CO), 161.34 (quart. CO), 153.82 (quart. Ar-C), 143.19 (quart. Ar-C), 135.14 (quart. Ar-C), 131.52 (quart. Ar-C), 130.88 (quart. Ar-C), 129.86 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 127.19 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 126.67 (quart. Ar-C), 112.42 (+, Ar-CH), 111.55 (+, Ar-CH), 105.46 (quart. Ar-C), 101.34 (+, Ar-CH), 81.19 (quart. OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 69.99 (-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 49.41 (-, NCH<sub>2</sub>CH), 46.71 (-, NCH<sub>2</sub>Ar), 46.57 (-, NCH<sub>2</sub>C), 36.45 (+, NCH<sub>2</sub>CH), 28.20 (+, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.87 (+, NCH<sub>3</sub>), 22.68 (-, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 10.96 (+, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). MS (C<sub>29</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 448,19 [MH<sup>+</sup>-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>] (100), 504,25 [MH<sup>+</sup>] (30,49), 526,23 [MNa<sup>+</sup>] (29,02), 1029,48 [2MNa<sup>+</sup>] (6). Anal. (C<sub>29</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>) ber. : C 69,17 H 6,61; N 8,34; gef.: C 69,08; H 6,43; N 8,31.

***tert*-Butyl 4-((8-butoxy-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(*1H*)-yl)methyl)benzoat (**22g**)**

**C<sub>30</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (M = 517,26 g/mol)**



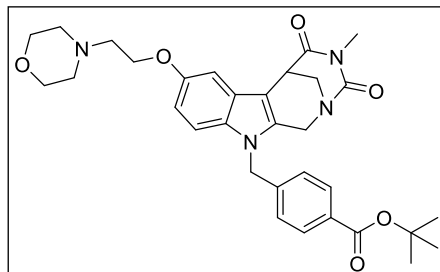
Synthese nach **AV5a** aus *tert*-Butyl 4-((8-Hydroxy-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*] indol-11(*1H*)-yl)methyl)benzoat (**22d**) (0,10 g, 0,22 mmol) und 1-Brombutan (**29**) (0,045 g, 0,33 mmol). Kristallisation (Ethylacetat) ergab einen Feststoff (0,065 g, 0,13 mmol; 57 %). Smp.: 205,5 - 207,2 °C. IR (KBr): 2962; 2928; 1711; 1680 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.27 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.13 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 6.97 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 6.73 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 5.39 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.79 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.51 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 3.99 – 3.92 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.91 – 3.85 (m, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.83 (s, 1H, NCH<sub>2</sub>CH), 3.42 (dd, *J* = 9.1, 3.9 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 2.89 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.75 – 1.64 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.51 (s, 9H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.49 – 1.38 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.94 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 173.64 (quart. CO), 165.10 (quart. CO), 161.34 (quart. CO), 153.84 (quart. Ar-C), 143.17 (quart. Ar-C), 135.13 (quart. Ar-C), 131.52 (quart. Ar-C), 130.88 (quart. Ar-C), 129.86 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 127.19 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 126.67 (quart. Ar-C), 112.41 (+, Ar-CH), 111.54 (+, Ar-CH), 105.08 (quart. Ar-C), 101.34 (+, Ar-CH), 81.20 (quart. OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 68.13 (-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 49.40 (-, NCH<sub>2</sub>CH), 46.71 (-, NCH<sub>2</sub>Ar), 46.55 (-, NCH<sub>2</sub>C), 36.45 (+, NCH<sub>2</sub>CH), 31.40 (-, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 28.20 (+, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.88 (+, NCH<sub>3</sub>), 19.26 (-, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 14.20 (+, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). MS (C<sub>30</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 462,20 [MH<sup>+</sup>-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>] (100), 518,27 [MH<sup>+</sup>] (32,91), 540,25 [MNa<sup>+</sup>] (33,64), 1057,51 [2MNa<sup>+</sup>] (4,48). Anal. (C<sub>30</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>) ber.: C 69,61; H 6,82; N 8,12; gef.: C 69,28; H 6,82; N 7,86.

**tert-Butyl 4-((4-methyl-8-(2-morpholinoethoxy)-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoat (**22h**)**

**C<sub>32</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (M = 574,28 g/mol)**



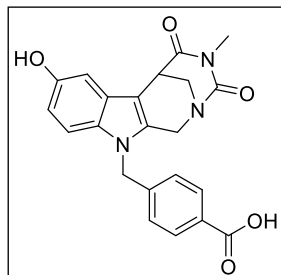
Eine Mischung bestehend aus **22d** (0,28 g, 0,61 mmol), 4-(2-Chloroethyl)morpholin hydrochlorid (**30**) (0,15 g, 0,81 mmol) und K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,42 g, 3,0 mmol) in 2-Butanon (30,0 mL) wurde für 4 Tage refluxiert. Anschließend wurde diese auf Raumtemperatur abgekühlt, der Feststoff

(K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) abfiltriert und das LM am Rotationsverdampfer entfernt. SC (SiO<sub>2</sub>; DCM / MeOH (10:1)) ergab einen Feststoff (0,24 g, 0,42 mmol, 68 %). Smp.: 111,0 - 111,9 °C; IR (KBr): 2957; 2857; 1714; 1687 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.91 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.15 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.09 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.03 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar-H), 6.83 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 5.28 (d, *J* = 17.0 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>Ar), 5.09 (d, *J* = 17.0 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>Ar), 4.84 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.25 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.22 – 4.19 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.89 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.85 (br s, 1H, NCH<sub>2</sub>CH), 3.79 (br s, 4H, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N - Morpholin), 3.32 (dd, *J* = 13.1, 2.1 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.06 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.95 – 2.84 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.69 (br s, 4H, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N - Morpholin), 1.56 (s, 9H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 173.14 (quart. CO), 165.17 (quart. CO), 161.27 (quart. CO), 153.91 (quart. O-Ar-C), 141.05 (quart. Ar-C), 133.73 (quart. Ar-C), 131.84 (quart. Ar-C), 131.78 (quart. Ar-C), 130.19 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 126.47 (quart. Ar-C), 126.07 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 113.34 (+, Ar-CH), 110.41 (+, Ar-CH), 105.95 (quart. Ar-C), 101.37 (+, Ar-CH), 81.26 (quart. OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 66.83 (-, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N - Morpholin), 66.35 (-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 57.76 (-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 54.04 (-, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N - Morpholin), 49.47 (-, NCH<sub>2</sub>C), 47.38 (-, NCH<sub>2</sub>CH), 47.12 (-, NCH<sub>2</sub>Ar), 36.87 (+, NCH<sub>2</sub>CH), 28.16 (+, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.91 (+, NCH<sub>3</sub>). MS (C<sub>32</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 575,29 [MH<sup>+</sup>] (100), 1171,55 [2MNa<sup>+</sup>] (0,3). Anal. (C<sub>32</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>) ber.: C 66,88 H 6,67; N 9,75; gef.: C 66,51; H 6,62; N 9,55.

**4-((8-Hydroxy-4-methyl-3.5-dioxo-3.4.5.6-tetrahydro-2.6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(*1H*)-yl)methyl)benzoesäure (23d)**

**C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (M = 405,13 g/mol)**



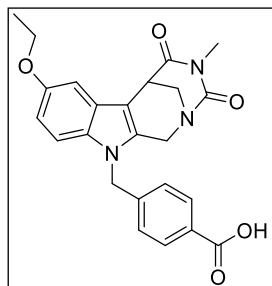
Synthese gemäß **AV6** ausgehend von *tert*-Butyl 4-((8-hydroxy-4-methyl-3.5-dioxo-3.4.5.6-tetrahydro-2.6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(*1H*)-yl)methyl)benzoat (**22d**) (0,50 g, 1,08 mmol).

Extraktion (DCM) aus TFA / H<sub>2</sub>O (15:1) und Umkristallisation (Acetonitril) ergaben einen Feststoff (0,33 g, 0,81 mmol; 75 %).

Smp.: 270,5 - 273,4 °C. IR (KBr): 2924; 2853; 1710; 1676; 1646 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.91 (s, 1H), 8.90 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.16 (dd, *J* = 14.5, 8.5 Hz, 3H), 6.86 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.59 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 5.35 (s, 2H), 4.78 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 4.50 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 3.86 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H), 3.75 (s, 1H), 3.42 (d, *J* = 14.3 Hz, 1H), 2.89 (s, 3H). MS (C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 406,14 [MH<sup>+</sup>] (100), 833,25 [2MNa<sup>+</sup>] (3,23). Anal. (C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>) ber.: C 65,18; H 4,72; N 10,37, gef.: C 64,81; H 4,87; N 10,10.

**4-((8-Ethoxy-4-methyl-3.5-dioxo-3.4.5.6-tetrahydro-2.6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(*1H*)-yl)methyl)benzoesäure (23e)**

**C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (M = 433,16 g/mol)**



Die Verbindung wurde nach **AV6**, ausgehend von *tert*-Butyl 4-((8-butoxy-4-methyl-3.5-dioxo-3.4.5.6-tetrahydro-2.6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(*1H*)-yl)methyl)benzoat (**22e**) (0,50 g, 1,02 mmol)

synthetisiert. Die TFA-Lösung wurde solange mit H<sub>2</sub>O verdünnt bis die Carbonsäure aus dem Reaktionsansatz auskristallisierte.

Umkristallisation (Ethylacetat) ergab einen Feststoff (0,39 g,

0,90 mmol; 88 %). Smp.: 236,3 - 239,9 °C. IR (KBr): 3171; 2964; 2923; 1712; 1664 cm<sup>-1</sup>.

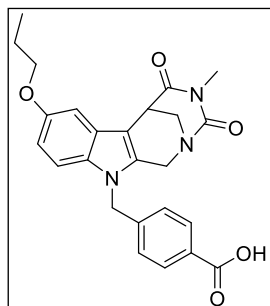
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.93 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.74 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 5.40 (s, 2H), 4.80 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 4.51 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 4.07 – 3.94 (m, 2H), 3.88 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H), 3.83 (s, 1H), 3.45 (s, 1H), 2.89 (s, 3H), 1.33 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H).

MS (C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 434,17 [MH<sup>+</sup>] (100), 889,32 [2MNa<sup>+</sup>] (1,37).

Anal. (C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>) ber.: C 66,50; H 5,35; N 9,69; gef.: C 66,13; H 5,52; N 9,37.

**4-((4-Methyl-3.5-dioxo-8-propoxy-3.4.5.6-tetrahydro-2.6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoesäure (23f)**

**C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (M = 447,18 g/mol)**

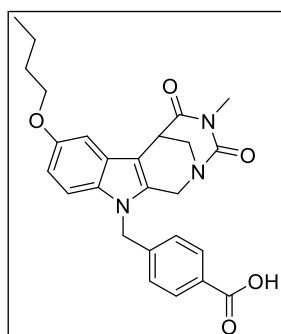


Synthese nach **AV6**, ausgehend von *tert*-Butyl 4-((4-methyl-3.5-dioxo-8-propoxy-3.4.5.6-tetrahydro-2.6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoat (**22f**) (0,50 g, 1,00 mmol). Die TFA-Lösung wurde solange mit H<sub>2</sub>O verdünnt bis die Carbonsäure aus dem Reaktionsansatz auskristallisierte. Umkristallisation (Aceton) ergab einen Feststoff (0,43 g, 0,90 mmol; 96 %). Smp.: 262,3 - 263,3 °C.

IR (KBr): 3195; 2962; 2873; 1713; 1665 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.92 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.74 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 5.40 (s, 2H), 4.80 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 4.52 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 3.90 (dd, *J* = 9.7, 6.7 Hz, 2H), 3.86 (s, 1H), 3.84 (s, 1H), 3.44 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H), 2.89 (s, 3H), 1.74 (dd, *J* = 14.0, 6.9 Hz, 2H), 0.99 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). MS (C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 448,19 [MH<sup>+</sup>] (100), 917,35 [2MNa<sup>+</sup>] (1,55). Anal. (C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>) ber.: C 67,10; H 5,63; N 9,39; gef.: C 66,93; H 5,89; N 9,02.

**4-((8-Butoxy-4-methyl-3.5-dioxo-3.4.5.6-tetrahydro-2.6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoesäure (23g)**

**C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (M = 461,20 g/mol)**



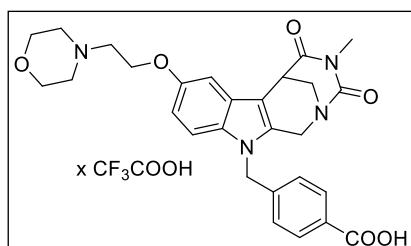
Darstellung nach **AV6** aus *tert*-Butyl 4-((8-butoxy-4-methyl-3.5-dioxo-3.4.5.6-tetrahydro-2.6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoat (**22g**) (0,50 g, 0,97 mmol). Die TFA-Lösung wurde solange mit H<sub>2</sub>O verdünnt bis das Produkt aus dem Reaktionsansatz auskristallisiert. (0,47 g, 1,02 mmol; 95 %). Smp.: 268,9 - 271,4 °C. IR (KBr): 2957; 2870; 1712; 1661 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.94 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.76 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 5.40 (s, 2H), 4.80 (d, *J* = 16.7 Hz, 1H), 4.51 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 3.94 (dd, *J* = 11.8, 8.1 Hz, 2H), 3.85 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.43 (d, *J* = 13.0 Hz, 2H), 2.89 (s, 3H), 1.69 (dd, *J* = 14.7, 6.5 Hz, 2H), 1.45 (dd, *J* = 15.1, 7.4 Hz, 2H), 0.94 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). HRMS (C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>, ESI-MS) *m/z* ber.:

479,2289 [MNH<sub>4</sub><sup>+</sup>], gef.: 479,2292 [MNH<sub>4</sub><sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 98,8 %,  $t_R$  = 20,9 min.

**4-(2-((11-(4-carboxybenzyl)-4-methyl-3,5-dioxo-1,3,4,5,6,11-hexahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-8-yl)oxy)ethyl)morpholin-4-ium 2,2,2 trifluoroacetat (23h)**

**C<sub>30</sub>H<sub>31</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> (M = 632,21 g/mol)**

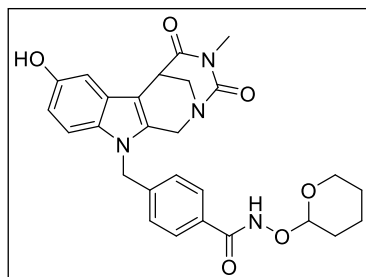


In Anlehnung an **AV6** wurde *tert*-Butyl 4-((4-methyl-8-(2-morpholinoethoxy)-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*] indol-11(1*H*)-yl)methyl)-benzoat (**22h**) (0,82 g, 1,43 mmol) in DCM (25 mL) gelöst, TFA (10,0 mL) zur Lösung hinzuge tropft und diese für 2 Std

bei Raumtemperatur gerührt. Das LM sowie der Überschuss an TFA wurden bei Raumtemperatur in eine Kühlfalle mittels HV-Pumpe abgezogen. Ausbeute (0,90 g, 1,42 mmol; 99 %) gelber Feststoff. Smp.: 182,9 - 184,0 °C. IR (KBr): 3441; 1642 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.98 (s, 1H), 9.95 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.36 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.10 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.85 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 5.43 (s, 2H), 4.82 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 4.54 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 4.34 (s, 2H), 3.99 (d, *J* = 11.3 Hz, 2H), 3.91 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H), 3.83 (s, 1H), 3.71 (t, *J* = 11.9 Hz, 2H), 3.64 – 3.49 (m, 4H), 3.45 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H), 3.23 (s, 2H), 2.90 (s, 3H). <sup>19</sup>F-NMR (377 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ -73.16 (s). HRMS (C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>, ESI-MS) *m/z* ber.: 519,2238 [MH<sup>+</sup>], gef.: 519,2237 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode B): 100,0 %,  $t_R$  = 10,5 min.

**4-((8-Hydroxy-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (26d)**

**C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (M = 504,20 g/mol)**



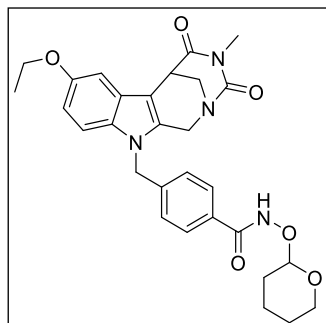
Darstellung gemäß **AV7** ausgehend von 4-((8-Hydroxy-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoesäure (**23d**) (0,33 g, 0,81 mmol). SC (Ethylacetat) und Kristallisation (MeOH) ergaben einen Feststoff (0,28 g, 0,55 mmol; 69 %). Smp.:

213,6 - 214,9 °C. IR (KBr): 2954; 1718; 1667; 1617 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ

11.60 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 7.67 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.15 (dd,  $J = 12.7, 8.5$  Hz, 3H), 6.86 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 6.58 (dd,  $J = 8.8, 2.3$  Hz, 1H), 5.32 (s, 2H), 4.96 (s, 1H), 4.80 (d,  $J = 16.6$  Hz, 1H), 4.51 (d,  $J = 16.4$  Hz, 1H), 4.02 (s, 1H), 3.87 (d,  $J = 12.7$  Hz, 1H), 3.75 (s, 1H), 3.54 – 3.48 (m, 1H), 3.42 (d,  $J = 11.1$  Hz, 1H), 2.89 (s, 3H), 1.61 (m, 6H). HRMS ( $C_{27}H_{28}N_4O_6$ , ESI-MS)  $m/z$ : ber.: 505,2082  $[MH^+]$ , gef.: 505,2080  $[MH^+]$ . RP-HPLC (220 nm, Methode A): 99,0 %,  $t_R = 11,0$  min.

**4-((8-Ethoxy-4-methyl-3.5-dioxo-3.4.5.6-tetrahydro-2.6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(*1H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (26e)**

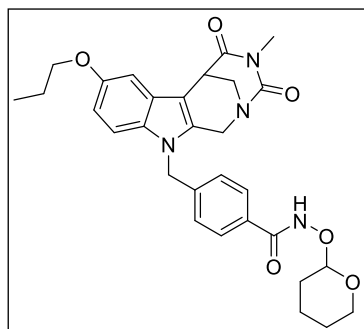
$C_{29}H_{32}N_4O_6$  ( $M = 532,23$  g/mol)



Die Verbindung wurde nach **AV7** aus 4-((8-Ethoxy-4-methyl-3.5-dioxo-3.4.5.6-tetrahydro-2.6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(*1H*)-yl)methyl)benzoesäure (**23e**) (0,39 g, 0,90 mmol) synthetisiert. SC (DCM / MeOH (10:1)) ergab einen Feststoff (0,29 g, 0,54 mmol; 61 %). Smp.: 154,7 - 155,0 °C. IR (KBr): 2949; 1728; 1683  $cm^{-1}$ .  $^1H$ -NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  11.60 (s, 1H), 7.67 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.28 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.13 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 6.96 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 6.73 (dd,  $J = 8.9, 2.4$  Hz, 1H), 5.37 (s, 2H), 4.95 (s, 1H), 4.82 (d,  $J = 16.5$  Hz, 1H), 4.53 (d,  $J = 16.5$  Hz, 2H), 4.00 (dd,  $J = 7.0, 2.6$  Hz, 2H), 3.89 (d,  $J = 13.1$  Hz, 1H), 3.83 (br s, 1H), 3.55 – 3.43 (m, 2H), 2.89 (s, 3H), 1.72 – 1.55 (m, 6H), 1.33 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H). HRMS ( $C_{29}H_{32}N_4O_6$ , ESI-MS)  $m/z$ : ber.: 533,2395  $[MH^+]$ , gef.: 533,2395  $[MH^+]$ . RP-HPLC (220 nm, Methode A): 99,1 %,  $t_R = 17,4$  min.

**4-((4-Methyl-3.5-dioxo-8-propoxy-3.4.5.6-tetrahydro-2.6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(*1H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (26f)**

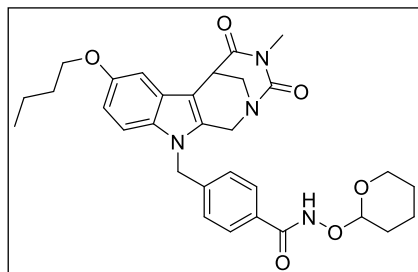
$C_{30}H_{34}N_4O_6$  ( $M = 546,25$  g/mol)



Synthese gemäß **AV7** ausgehend von 4-((4-Methyl-3.5-dioxo-8-propoxy-3.4.5.6-tetrahydro-2.6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(*1H*)-yl)methyl)benzoesäure (**23f**) (0,45 g, 1,00 mmol). SC (DCM / Ethylacetat (1:2)) und Kristallisation (Acetonitril) ergaben einen Feststoff (0,39 g, 0,85 mmol; 85 %). Smp.: 201,8 - 202,1 °C. IR (KBr): 2942; 1725; 1682; 1645  $cm^{-1}$ .

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  11.60 (s, 1H), 7.67 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.28 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.13 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 6.97 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 6.74 (dd,  $J = 8.9, 2.4$  Hz, 1H), 5.37 (s, 2H), 4.96 (s, 1H), 4.82 (d,  $J = 16.6$  Hz, 1H), 4.53 (d,  $J = 16.5$  Hz, 1H), 4.03 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 3.94 – 3.88 (m, 2H), 3.85 (d,  $J = 9.4$  Hz, 2H), 3.55 – 3.48 (m, 1H), 3.47 – 3.38 (m, 2H), 2.89 (s, 3H), 1.70 – 1.51 (m, 6H), 0.99 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H). MS ( $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_6$ , LC-MS, ESI)  $m/z$  (%): 463,20 [ $\text{MH}^+ - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}$ ] (100), 547,26 [ $\text{MH}^+$ ] (9,95), 569,24 [ $\text{MNa}^+$ ] (11,27). Anal. ( $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_6$ ) ber.: C 65,92; H 6,27; N 10,25; gef.: C 65,90; H 6,15; N 10,05.

**4-((8-Butoxy-4-methyl-3.5-dioxo-3.4.5.6-tetrahydro-2.6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (26g)**  
 **$\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_6$  (M = 560,26 g/mol)**



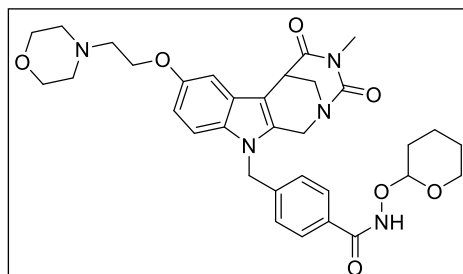
Synthese nach **AV7** ausgehend von 4-((8-Butoxy-4-methyl-3.5-dioxo-3.4.5.6-tetrahydro-2.6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoesäure (**23g**) (0,47 g, 1,02 mmol). SC (DCM / MeOH (10:1)) ergab einen Feststoff (0,34 g, 0,61 mmol; 60 %)). Smp.:

123,7 - 126,5 °C. IR (KBr): 2925; 1723; 1676; 1653  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  11.60 (s, 1H), 7.67 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.28 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.13 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 6.97 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 6.73 (dd,  $J = 8.9, 2.4$  Hz, 1H), 5.37 (s, 2H), 4.95 (s, 1H), 4.82 (d,  $J = 16.6$  Hz, 1H), 4.53 (d,  $J = 16.7$  Hz, 1H), 4.07 – 3.74 (m, 5H), 3.54 – 3.46 (m, 1H), 3.44 (d,  $J = 11.2$  Hz, 2H), 2.89 (s, 3H), 1.70 – 1.53 (m, 6H), 1.48 – 1.41 (m, 3H), 0.94 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H). HRMS ( $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_6$ , ESI-MS)  $m/z$  ber.: 561,2708 [ $\text{MH}^+$ ], 561,2710 [ $\text{MH}^+$ ]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 95,5 %,  $t_R = 22,1$  min.



**4-((4-Methyl-8-(2-morpholinoethoxy)-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(*1H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (**26h**)**

**C<sub>33</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (M = 617,29 g/mol)**

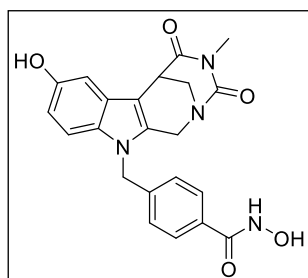


Die Synthese erfolgte gemäß **AV7** ausgehend von 4-((11-(4-Carboxybenzyl)-4-methyl-3,5-dioxo-1,3,4,5,6,11-hexahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-8-yl)oxy)ethyl)morpholin-4-ium 2,2,2-trifluoroacetat (**23h**) (0,63 g, 1,00 mmol). SC (DCM / MeOH (20:1))

ergab einen farblosen Schaum (0,66 g, 1,00 mmol, 99 %). IR (KBr): 2923; 1729; 1684 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.60 (s, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.12 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.00 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.75 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 5.37 (s, 2H), 4.95 (s, 1H), 4.82 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 4.53 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 4.13 – 3.98 (m, 3H), 3.89 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 3.84 (s, 1H), 3.59 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H), 3.57 (s, 2H), 3.53 – 3.39 (m, 2H), 2.89 (s, 3H), 2.70 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.54 (s, 2H), 1.67 – 1.51 (m, 6H), 1.17 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H). HRMS (C<sub>33</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, ESI-MS) *m/z* (%) ber.: 618,2922 [MH<sup>+</sup>], gef.: 618,2928 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 98,6 %, *t<sub>R</sub>* = 5,6 min.

***N*-Hydroxy-4-((8-hydroxy-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(*1H*)-yl)methyl)benzamid (**13d**)**

**C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (M = 420,14 g/mol)**



Die Verbindung wurde gemäß **AV8** ausgehend von 4-((8-Hydroxy-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(*1H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (**26d**) (0,32 g, 0,63 mmol) synthetisiert. Das LM (MeOH) wurde bis zur Präzipitation des Feststoffes

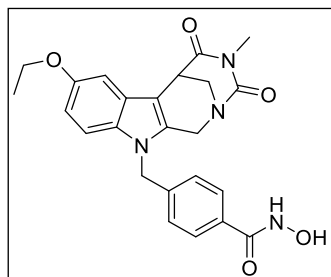
eingengt (0,10 g, 0,24 mmol; 38 %). Smp.: 259,8 – 261,0 °C. IR (KBr): 2959; 1727; 1679; 1643; 1571 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.14 (s, 1H, NHOH), 8.99 (s, 1H, NHOH), 8.87 (s, 1H, Ar-OH), 7.64 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.16 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.10 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar-H), 6.85 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 6.58 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 5.29 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.79 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.51 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H,

NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 3.86 (d,  $J = 12.8$  Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.74 (s, 1H, NCH<sub>2</sub>CH), 3.42 (dd,  $J = 13.2, 2.1$  Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 2.88 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  173.67 (quart. CO), 164.31 (quart. CO), 161.38 (quart. CO), 151.96 (quart. Ar-C), 141.42 (quart. Ar-C), 134.87 (quart. Ar-C), 132.30 (quart. Ar-C), 130.82 (quart. Ar-C), 127.67 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 127.08 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 126.99 (quart. Ar-C), 112.20 (+, Ar-CH), 111.30 (+, Ar-CH), 104.76 (quart. Ar-C), 102.47 (+, Ar-CH), 49.48 (-, NCH<sub>2</sub>C), 46.78 (-, NCH<sub>2</sub>CH), 46.49 (-, NCH<sub>2</sub>Ar), 36.60 (+, NCH<sub>2</sub>CH), 27.87 (+, NCH<sub>3</sub>). HRMS (C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>, ESI-MS)  $m/z$ : ber.: 421,1506 [MH<sup>+</sup>], gef.: 421,1511 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 99,4 %,  $t_R = 5,8$  min.

**4-((8-Ethoxy-4-methyl-3.5-dioxo-3.4.5.6-tetrahydro-2.6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)-*N*-hydroxybenzamid (13e)**

**C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (M = 448,18 g/mol)**

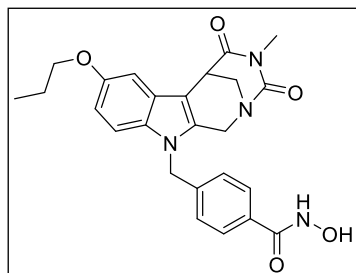


Die Verbindung wurde gemäß **AV8** ausgehend von 4-((8-Ethoxy-4-methyl-3.5-dioxo-3.4.5.6-tetrahydro-2.6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (**26e**) (0,29 g, 0,54 mmol) synthetisiert. Kristallisation (DCM / Ether (1:2)) ergab einen Feststoff (0,1 g, 0,22 mmol; 41 %). Smp.: 207,3 - 210,1 °C. IR (KBr): 2923; 1724; 1684; 1653 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.15 (s, 1H, NHOH), 9.00 (s, 1H, NHOH), 7.64 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.27 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.10 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar-H), 6.96 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.72 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 5.34 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.81 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.53 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.02 – 3.95 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.88 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.82 (s, 1H, NCH<sub>2</sub>CH), 3.43 (dd, *J* = 13.2, 2.1 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 2.89 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.32 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 173.59 (quart. CO), 164.28 (quart. CO), 161.34 (quart. CO), 153.64 (quart. Ar-C), 141.29 (quart. Ar-C), 135.15 (quart. Ar-C), 132.31 (quart. Ar-C), 131.49 (quart. Ar-C), 127.69 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 127.06 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 126.67 (quart. Ar-C), 112.39 (+, Ar-CH), 111.61 (+, Ar-CH), 105.36 (quart. Ar-C), 101.28 (+, Ar-CH), 63.93 (-, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 49.45 (-, NCH<sub>2</sub>CH), 46.72 (-, NCH<sub>2</sub>Ar), 46.54 (-, NCH<sub>2</sub>C), 36.48 (+, NCH<sub>2</sub>CH), 27.86 (+, NCH<sub>3</sub>), 15.31 (+, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). HRMS (C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>, ESI-MS) *m/z* ber.: 471,1639 [MNa<sup>+</sup>], gef.: 471,1644 [MNa<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 95,8 %, *t<sub>R</sub>* = 12,0 min.

***N*-Hydroxy-4-((4-methyl-3.5-dioxo-8-propoxy-3.4.5.6-tetrahydro-2.6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzamid (13f)**

**C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (M = 462,19 g/mol)**



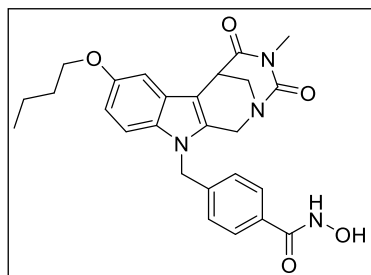
Synthese gemäß **AV8** ausgehend von 4-((4-Methyl-3.5-dioxo-8-propoxy-3.4.5.6-tetrahydro-2.6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (**26f**) (0,39 g, 0,85 mmol). Kristallisation (DCM / Ether (1:2)) ergab einen Feststoff (0,10 g, 0,22 mmol; 25 %). Smp.:

166,8 - 169,1 °C. IR (KBr): 2924; 1732; 1666 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.14 (s, 1H, NHOH), 8.99 (s, 1H, NHOH), 7.65 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.27 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.10 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 6.96 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.73 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 5.34 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.81 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.53 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 3.90 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.86 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.82 (s, 1H, NCH<sub>2</sub>CH), 3.43 (dd, *J* = 13.2, 2.1 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 2.89 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.79 – 1.65 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.98 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 173.61 (quart. C=O), 163.08 (quart. C=O), 161.33 (quart. C=O), 153.81 (quart. Ar-C), 141.29 (quart. Ar-C), 135.16 (quart. Ar-C), 132.34 (quart. Ar-C), 131.49 (quart. Ar-C), 127.68 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 127.05 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 126.67 (quart. Ar-C), 112.38 (+, Ar-CH), 111.60 (+, Ar-CH), 105.35 (quart. Ar-C), 101.33 (+, Ar-CH), 69.98 (-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 49.45 (-, NCH<sub>2</sub>CH), 46.72 (-, NCH<sub>2</sub>Ar), 46.54 (-, NCH<sub>2</sub>C), 36.47 (+, NCH<sub>2</sub>CH), 27.86 (+, NCH<sub>3</sub>), 22.70 (-, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 10.97 (+, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). HRMS (C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>, ESI-MS) *m/z* ber.: 485,1795 [MNa<sup>+</sup>], gef.: 485,1797 [MNa<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 96,6 %, *t*<sub>R</sub> = 14,6 min.

**4-((8-Butoxy-4-methyl-3.5-dioxo-3.4.5.6-tetrahydro-2.6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)-*N*-hydroxybenzamid (13g)**

**C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (M = 476,21 g/mol)**



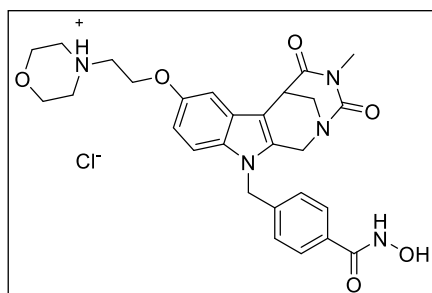
Synthese gemäß **AV8** ausgehend von 4-((8-Butoxy-4-methyl-3.5-dioxo-3.4.5.6-tetrahydro-2.6-methano[1.3]diazocino[5.6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (**26g**) (0,34 g, 0,61 mmol). Kristallisation (DCM / Ether (1:2)) ergab einen Feststoff (0,08 g, 0,17 mmol; 28 %).

Smp.: 146,5 - 149,2 °C. IR (KBr): 2927; 1733; 1683; 1657 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.17 (s, 1H, NHOH), 9.02 (s, 1H, NHOH), 7.65 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.28 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.10 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 6.97 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 6.73 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 5.35 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.83 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.54 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.02 – 3.92 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.89 (d, *J* = 13.8 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.83 (s, 1H, NCH<sub>2</sub>CH), 3.44 (dd, *J* = 13.1, 2.0 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 2.89 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.77 – 1.64 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.53 – 1.38 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.94 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  173.61 (quart.  $\text{C=O}$ ), 164.29 (quart.  $\text{C=O}$ ), 161.34 (quart.  $\text{C=O}$ ), 153.78 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 141.31 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 135.16 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 132.33 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 131.49 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 127.70 (+, (Ar- $\text{CH}$ ) $_2$ ), 127.05 (+, (Ar- $\text{CH}$ ) $_2$ ), 126.67 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 112.38 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 111.60 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 105.36 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 101.33 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 68.12 (-,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 49.45 (-,  $\text{NCH}_2\text{C}$ ), 46.72 (-,  $\text{NCH}_2\text{Ar}$ ), 46.54 (-,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ), 36.47 (+,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ), 31.43 (-,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 27.87 (+,  $\text{NCH}_3$ ), 19.28 (-,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 14.22 (+,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ). HRMS ( $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_5$ , ESI-MS)  $m/z$  ber.: 499,1952 [ $\text{MNa}^+$ ], gef.: 499,1959 [ $\text{MNa}^+$ ]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 98,7 %,  $t_R$  = 16,9 min.

**4-(2-((11-(4-(Hydroxycarbamoyl)benzyl)-4-methyl-3,5-dioxo-1,3,4,5,6,11-hexahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-8-yl)oxy)ethyl)morpholin-4-ium chlorid (13h)**

$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{ClN}_5\text{O}_6$  (M = 569,20 g/mol)



Darstellung nach **AV8**, ausgehend von 4-((4-methyl-8-(2-morpholinoethoxy)-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)-*N*-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (**26h**) (1,15 g, 1,86 mmol). Nach 2 Std Reaktionszeit bei Raumtemperatur kommt es zur Präzipitation, das LM

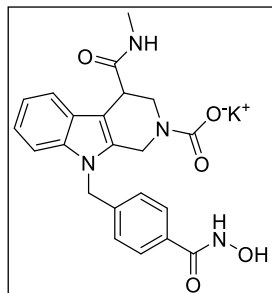
wurde vorsichtig abdekantiert und der Rückstand in der nötigen Menge an MeOH gelöst. Diese Lösung wurde dann tropfenweise zu einer Mischung (60 mL) bestehend aus Petrolether / Diethylether (1:1) hinzugegeben. Der auf diese Weise erhaltene gelbe Feststoff wurde abgesaugt und *in vacuo* getrocknet (0,80 g, 1,40 mmol; 75 %). Smp.: 158,4 - 162,0 °C. IR (KBr): 3425; 1653; 1457  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  11.18 (s, 1H,  $\text{NHOH}$ ), 9.00 (s, 1H,  $\text{NHOH}$ ), 7.65 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H, Ar- $\text{H}$ ), 7.33 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1H, Ar- $\text{H}$ ), 7.09 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H, Ar- $\text{H}$ ), 7.05 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H, Ar- $\text{H}$ ), 6.82 (dd,  $J$  = 8.9, 2.4 Hz, 1H, Ar- $\text{H}$ ), 5.36 (s, 2H,  $\text{NCH}_2\text{Ar}$ ), 4.82 (d,  $J$  = 16.6 Hz, 1H,  $\text{NCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{C}$ ), 4.55 (d,  $J$  = 16.5 Hz, 1H,  $\text{NCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{C}$ ), 4.46 – 4.33 (m, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.98 - 3.90 (m, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$  - Morpholin), 3.89 – 3.85 (m, 1H,  $\text{NCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{CH}$ ), 3.84 – 3.81 (m, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$  - Morpholin), 3.81 (s, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ), 3.54 (br s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.51 – 3.45 (m, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$  - Morpholin), 3.42 – 3.30 (m, 1H,  $\text{NCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{CH}$ ), 3.20 (br s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$  - Morpholin), 2.89 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  173.58 (quart.  $\text{C=O}$ ), 164.26 (quart.  $\text{C=O}$ ), 161.31 (quart.  $\text{C=O}$ ), 152.68 (quart. O-Ar-C), 141.20 (quart. Ar-C), 135.61 (quart. Ar-C), 132.34 (quart. Ar-C), 131.99 (quart. Ar-C), 127.72 (-, (Ar-CH) $_2$ ), 127.02 (-, (Ar-CH) $_2$ ), 126.61 (quart. Ar-C), 112.22 (-, Ar-CH), 111.75 (-, Ar-CH), 105.50 (quart. Ar-C), 102.20 (-, Ar-CH), 63.63 (+, O(CH $_2$ ) $_2$ CH $_2$ N - Morpholin), 63.37 (+, OCH $_2$ CH $_2$ ), 55.58 (+, OCH $_2$ CH $_2$ ), 52.14 (+, O(CH $_2$ ) $_2$ (CH $_2$ ) $_2$ N - Morpholin), 49.44 (+, NCH $_2$ C), 46.70 (+, NCH $_2$ CH), 46.51 (+, NCH $_2$ Ar), 36.49 (-, NCH $_2$ CH), 27.78 (-, NCH $_3$ ). Bei der Aufnahme des Dept 135-Spektrums erschienen bei dieser Verbindung, die CH $_2$ -Gruppen im „positiven“ Bereich und die CH- bzw. CH $_3$ - Gruppen im „negativen“. HRMS (C $_{28}$ H $_{31}$ N $_5$ O $_6$ , ESI-MS)  $m/z$  ber.: 534,2347 [MH $^+$ ], gef.: 534,2351 [MH $^+$ ]. RP-HPLC (220 nm, Methode B): 99,7 %,  $t_R$  = 8,3 min.

### 9.4.2 Hydrolyseprodukt-Analogon 32

#### Kalium-9-(4-(Hydroxycarbamoyl)benzyl)-4-(methylcarbamoyl)-1,3,4,9-tetrahydro-2H-pyrido[3,4-*b*]indol-2-carboxylat (32)

$\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{KN}_4\text{O}_5 \times \frac{1}{2} \text{KOH}$  ( $M = 460,12 \text{ g/mol}$ )



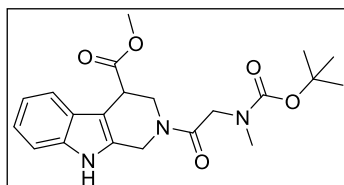
Die Synthese der HPLC-Referenz erfolgte, ausgehend von *N*-Hydroxy-4-((4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano [1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzamid (**13a**) (0,05 g, 0,12 mmol). **13a** wurde in einer THF / H<sub>2</sub>O-Mischung (1:1) gelöst, 1,5 eq KOH (6,93 mg) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das LM wurde abgezogen. Man erhielt einen Feststoff (0,05 g, 0,12 mmol; 99 %). Smp.: 157,6 °C. IR (KBr): 1629; 1551 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  9.58 (s, 1H, NHOH), 7.67 – 7.62 (m, 2H, Ar-H), 7.41 – 7.37 (m, 2H, Ar-H), 7.06 – 7.01 (m, 3H, Ar-H), 6.64 (d,  $J = 4.1 \text{ Hz}$ , 1H, Ar-H), 5.35 (d,  $J = 6.9 \text{ Hz}$ , 2H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.64 (d,  $J = 16.3 \text{ Hz}$ , 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.45 (d,  $J = 16.5 \text{ Hz}$ , 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.05 (dd,  $J = 12.4, 4.0 \text{ Hz}$ , 1H, NCH<sub>2</sub>CH), 3.98 – 3.93 (m, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.72 – 3.65 (m, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 2.59 (d,  $J = 4.0 \text{ Hz}$ , 3H, NHCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  173.23 (quart. CO), 163.92 (quart. CO), 158.42 (quart. CO), 139.16 (quart. Ar-C), 136.82 (quart. Ar-C), 134.27 (quart. Ar-C), 127.06 (+, Ar-CH), 126.50 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 126.44 (quart. Ar-C), 121.60 (+, Ar-CH), 119.80 (+, Ar-CH), 118.69 (+, Ar-CH), 110.37 (+, Ar-CH), 106.75 (quart. Ar-C), 105.79 (quart. Ar-C), 52.26 (+, Ar-CH), 46.32 (-, NCH<sub>2</sub>Ar), 44.30 (-, NCH<sub>2</sub>CH), 41.14 (-, NCH<sub>2</sub>C), 38.92 (+, NCH<sub>2</sub>CH), 27.60 (+, NHCH<sub>3</sub>). HRMS (C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>, ESI-MS)  $m/z$ : ber.: 423,1663 [MH<sup>+</sup>], gef.: 423,1665 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 95,0 %,  $t_R = 18,9 \text{ min}$ .

### 9.4.3 Inhibitor mit Kopfgruppe 2

#### Methyl 2-(2-((*tert*-butoxycarbonyl) (methyl)amino)acetyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat (**34**)

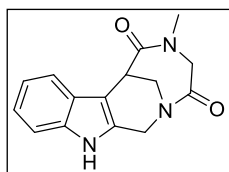
$C_{21}H_{27}N_3O_5$  (M = 401,20 g/mol)



Zu einer Suspension bestehend aus Methyl 2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat hydrochlorid (**18a**) (1,33 g, 5,00 mmol) in Acetonitril (50,0 mL) wurden Triethylamin (5,00 mL), Benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphonium-hexafluoro-phosphat (**24**) (2,65 g, 6,00 mmol) und *N*-*boc*-Sarcosin (**33**) (1,13 g, 6,00 mmol) hinzugegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 16 Std gerührt und anschließend auf H<sub>2</sub>O gegossen. Der resultierende Feststoff wurde abfiltriert. Säulenchromatographische Anreicherung (DCM / Ethylacetat; 1:1) ergab das entsprechende Rohprodukt (1,76 g, 4,38 mmol; 88 %), das direkt zur weiteren Synthese eingesetzt wurde. Smp.: 96,1 °C. IR (KBr): 2977; 1736; 1685 cm<sup>-1</sup>. HRMS ( $C_{21}H_{27}N_3O_5$ , ESI-MS)  $m/z$  ber.: 424,1843 [MNa<sup>+</sup>], gef.: 424,1842 [MNa<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 95,1 %,  $t_R$  = 17,9 min.

#### 5-Methyl-4,5-dihydro-1*H*-2,7-methano[1,4]diazonino[6,7-*b*]indol-3,6(7*H*,12*H*)-dion (**35**)

$C_{15}H_{15}N_3O_2$  (M = 269,12 g/mol)



Zu einer Lösung von Methyl 2-(2-((*tert*-butoxycarbonyl)(methyl)amino)acetyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat (**34**) (1,50 g, 3,74 mmol) in THF (10,0 mL) und MeOH (10,0 mL) wurde LiOH (0,108 g, 4,50 mmol) in H<sub>2</sub>O (10,0 mL) hinzugetropft. Die erhaltene Mischung wurde für 2 Std bei 60 °C gerührt. Das organische LM wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in HCl (30,0 mL; 5-6 N in 2-Propanol) aufgelöst. Die Mischung wurde für 3 Std bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das LM am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in DMF gelöst (20,0 mL) und Acetonitril (40,0 mL), Triethylamin (5,00 mL) und Benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluoro-phosphat (**24**) (2,65 g; 6,00 mmol) hinzugegeben. Die Mischung wurde für 24 Std bei Raumtemperatur gerührt und auf HCl (1 N in H<sub>2</sub>O) geschüttet. Anschließend wurde der Feststoff mit Ethylacetat (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden

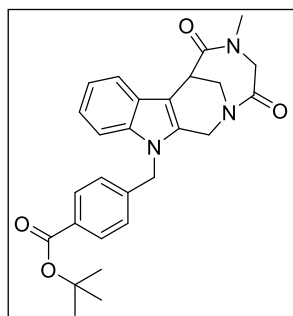


mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, getrocknet (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) und Solvens unter reduziertem Druck entfernt. SC (Ethylacetat / MeOH 10:1) und Kristallisation (Ethylacetat) gaben farblose Kristalle (0,41 g, 1,52 mmol; 41 %). Smp.: 297,7 - 298,0 °C. IR (KBr): 3230; 1669; 1607 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.05 (s, 1H, NH (Indol)), 7.80 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.28 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.07 – 6.92 (m, 2H, Ar-H), 5.15 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.96 (d, *J* = 13.8 Hz, 1H, OCCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>NCH<sub>3</sub>), 4.59 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 4.27 (dd, *J* = 15.7, 1.5 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 3.81 (s, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.58 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H, OCCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>NCH<sub>3</sub>), 3.50 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 2.92 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 173.25 (quart. CO), 170.65 (quart. CO), 136.14 (quart. Ar-C), 134.07 (quart. Ar-C), 127.10 (quart. Ar-C), 121.54 (+, Ar-CH), 120.37 (+, Ar-CH), 119.19 (+, Ar-CH), 111.42 (+, Ar-CH), 107.57 (quart. Ar-C), 54.57 (-, OCCH<sub>2</sub>NCH<sub>3</sub>), 45.47 (-, NCH<sub>2</sub>CH), 43.46 (-, NCH<sub>2</sub>C), 41.85 (+, NCH<sub>2</sub>CH), 38.22 (+, NCH<sub>3</sub>). MS (C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 270 [MH<sup>+</sup>] (100). Anal. (C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) ber.: C 66,90; H 5,61; N 15,60; gef.: C 66,68; H 5,58; N 15,53.

***tert*-Butyl 4-((5-methyl-3,6-dioxo-4,5,6,7-tetrahydro-1*H*-2,7-methano[1,4]diazonino[6,7-*b*]indol-12(3*H*)-yl)methyl)benzoat (36)**

**C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (M = 459,22 g/mol)**

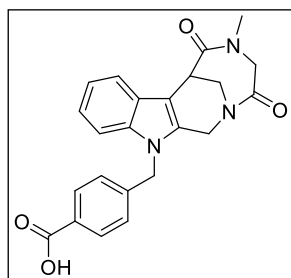


Die Darstellung erfolgte nach **AV5a** ausgehend von 5-Methyl-4,5-dihydro-1*H*-2,7-methano[1,4]diazonino[6,7-*b*]indol-3,6(7*H*,12*H*)-dion (**35**) (0,54 g, 2,00 mmol) und *tert*-Butyl 4-(bromomethyl)benzoat (**21**). Kristallisation aus DCM / n-Heptan ergab farblose Kristalle (0,68 g, 1,48 mmol; 74 %). Smp.: 239,4 - 240,2 °C. IR (KBr): 2975; 1684; 1639; 1462 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.91 – 7.86 (m, 1H, Ar-H), 7.82 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.35 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.22 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.10 – 6.99 (m, 2H, Ar-H), 5.50 – 5.40 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar), 5.29 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.97 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H, OCCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>N), 4.61 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 4.18 (dd, *J* = 15.9, 1.6 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 3.87 (s, 1H, NCH<sub>2</sub>CH), 3.60 (d, *J* = 13.8 Hz, 1H, OCCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>N), 3.54 (dd, *J* = 15.2, 3.8 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 2.94 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.51 (s, 9H, OC (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  173.22 (quart.  $\text{C=O}$ ), 170.49 (quart.  $\text{C=O}$ ), 165.09 (quart.  $\text{C=O}$ ), 143.30 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 136.58 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 135.09 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 130.86 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 129.84 (+, (Ar- $\text{CH}$ ) $_2$ ), 127.30 (+, (Ar- $\text{CH}$ ) $_2$ ), 127.01 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 121.92 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 120.74 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 119.78 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 110.11 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 108.15 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 81.14 (quart.  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 54.49 (-,  $\text{OCCH}_2\text{NCH}_3$ ), 46.37 (-,  $\text{NCH}_2\text{Ar}$ ), 45.27 (-,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ), 42.77 (-,  $\text{NCH}_2\text{C}$ ), 41.85 (+,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ), 38.21 (+,  $\text{NCH}_3$ ), 28.21 (+,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ). MS ( $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4$ , LC-MS, ESI)  $m/z$  (%): 404 [ $\text{MH}^+ - \text{C}_4\text{H}_8$ ] (100), 460 [ $\text{MH}^+$ ] (15,59). Anal. ( $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4$ ) ber.: C 70,57; H 6,36; N 9,14; gef.: C 70,33; H 6,36; N 9,00.

**4-((5-Methyl-3,6-dioxo-4,5,6,7-tetrahydro-1*H*-2,7-methano[1,4]diazonino[6,7-*b*]indol-12(3*H*)-yl)methyl)benzoesäure (37)**

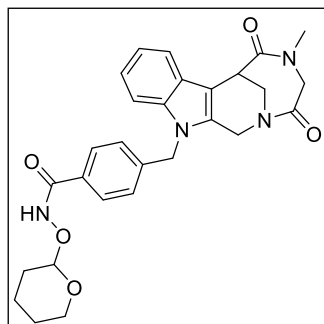
$\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4$  (M = 403,15 g/mol)



Die Freisetzung der Carbonsäure erfolgte nach **AV6** ausgehend von *tert*-Butyl 4-((5-methyl-3,6-dioxo-4,5,6,7-tetrahydro-1*H*-2,7-methano[1,4]diazonino[6,7-*b*]indol-12(3*H*)-yl)methyl)benzoat (**36**) (0,50 g, 1,09 mmol). Kristallisation (Ethylacetat) ergab einen Feststoff (0,49 g, 1,08 mmol; 99 %). Smp.: 295,3 - 296,6 °C. IR (KBr): 1711; 1638  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  12.91 (s, 1H), 8.04 – 7.71 (m, 3H), 7.41 – 7.32 (m, 1H), 7.22 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 7.11 – 6.99 (m, 2H), 5.46 (s, 2H), 5.30 (d,  $J$  = 15.9 Hz, 1H), 4.97 (d,  $J$  = 13.7 Hz, 1H), 4.61 (d,  $J$  = 15.0 Hz, 1H), 4.19 (dd,  $J$  = 15.9, 1.6 Hz, 1H), 3.87 (s, 1H), 3.60 (d,  $J$  = 13.7 Hz, 1H), 3.54 (dd,  $J$  = 15.1, 3.4 Hz, 1H), 2.93 (s, 3H). HRMS ( $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4$ , ESI-MS)  $m/z$  ber.: 426,1424 [ $\text{MNa}^+$ ] gef.: 426,1426 [ $\text{MNa}^+$ ]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 98,1 %,  $t_R$  = 10,7 min.

**4-((5-Methyl-3,6-dioxo-4,5,6,7-tetrahydro-1*H*-2,7-methano[1,4]diazonino[6,7-*b*]indol-12(3*H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (38)**

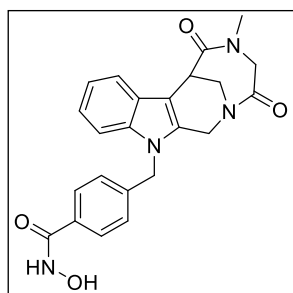
$\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_5$  (M = 502,22 g/mol)



Die Darstellung erfolgte nach **AV7** ausgehend von 4-((5-Methyl-3,6-dioxo-4,5,6,7-tetrahydro-1*H*-2,7-methano[1,4]diazonino[6,7-*b*]indol-12(3*H*)-yl)methyl)benzoesäure (**37**) (0,40 g, 0,87 mmol). Kristallisation (Ethylacetat) gab einen Feststoff (0,27 g, 0,54 mmol; 62 %). Smp.: 210,0 - 212,2 °C. IR (KBr): 3188; 2949;

1676; 1609  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  11.59 (s, 1H), 7.87 (dd,  $J = 7.0, 1.7$  Hz, 1H), 7.68 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.35 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 7.21 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.09–6.99 (m, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.32 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H), 5.07 – 4.86 (m, 2H), 4.61 (d,  $J = 15.0$  Hz, 1H), 4.20 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H), 4.02 (s, 1H), 3.87 (s, 1H), 3.60 (d,  $J = 13.7$  Hz, 1H), 3.57 – 3.43 (m, 2H), 2.94 (s, 3H), 1.70 – 1.53 (m, 6H). MS ( $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_5$ , LC-MS, ESI)  $m/z$  (%): 419 [ $\text{MH}^+$  - 3,4-dihydro-2H-pyran] (100), 503 [ $\text{MH}^+$ ] (14,14). Anal. ( $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_5$ ) ber.: C 66,92; H 6,02; N 11,15; gef.: C 66,68; H 6,24 N 10,84.

***N*-Hydroxy-4-((5-methyl-3,6-dioxo-4,5,6,7-tetrahydro-1*H*-2,7-methano[1,4]diazonino[6,7-*b*]indol-12(3*H*)-yl)methyl)benzamid (Marbostat-2) (39)**  
 **$\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4$  (M = 418,16 g/mol)**



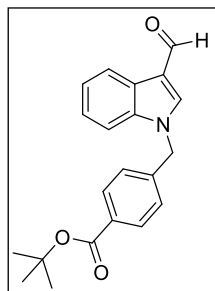
Verbindung **39** wurde nach **AV8** aus 4-((5-Methyl-3,6-dioxo-4,5,6,7-tetrahydro-1*H*-2,7-methano[1,4]diazonino[6,7-*b*]indol-12(3*H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (**38**) (0,18 g, 0,36 mmol) synthetisiert. Kristallisation ( $\text{H}_2\text{O} / \text{MeOH}$  (3:1)) ergab einen Feststoff (0,12 g, 0,29 mmol; 80 %). Smp.: 252,9 – 253,8 °C. IR (KBr): 3207; 2896; 1676; 1649; 1604  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  11.14 (s, 1H,  $\text{NH}\underline{\text{OH}}$ ), 8.99 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H,  $\text{NHO}\underline{\text{H}}$ ), 7.86 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 7.66 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 7.34 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 7.18 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 7.10 – 6.97 (m, 2H, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 5.40 (s, 2H,  $\text{NCH}_2\text{Ar}$ ), 5.32 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H,  $\text{NCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{C}$ ), 4.96 (d,  $J = 13.7$  Hz, 1H,  $\text{COCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{NCH}_3$ ), 4.60 (d,  $J = 15.1$  Hz, 1H,  $\text{NCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{CH}$ ), 4.20 (dd,  $J = 15.9, 1.5$  Hz, 1H,  $\text{NCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{C}$ ), 3.86 (s, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ), 3.59 (d,  $J = 13.8$  Hz, 1H,  $\text{COCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{NCH}_3$ ), 3.54 (dd,  $J = 15.4, 3.9$  Hz, 1H,  $\text{NCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{CH}$ ), 2.93 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  173.23 (quart.  $\underline{\text{CO}}$ ), 170.51 (quart.  $\underline{\text{CO}}$ ), 164.33 (quart.  $\underline{\text{CO}}$ ), 141.40 (quart.  $\underline{\text{C}}$ ), 136.52 (quart.  $\underline{\text{C}}$ ), 135.09 (quart.  $\underline{\text{C}}$ ), 132.33 (quart.  $\underline{\text{C}}$ ), 127.67 (+, (Ar- $\underline{\text{CH}}$ )<sub>2</sub>), 127.16 (+, Ar- $\underline{\text{CH}}$ ), 127.01 (quart.  $\underline{\text{C}}$ ), 121.89 (+, (Ar- $\underline{\text{CH}}$ )<sub>2</sub>), 120.74 (+, Ar- $\underline{\text{CH}}$ ), 119.75 (+, Ar- $\underline{\text{CH}}$ ), 110.17 (+, Ar- $\underline{\text{CH}}$ ), 108.03 (quart.  $\underline{\text{C}}$ ), 54.50 (-,  $\text{OCCH}_2\text{NCH}_3$ ), 46.34 (-,  $\text{NCH}_2\text{Ar}$ ), 45.28 (-,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ), 42.80 (-,  $\text{NCH}_2\text{C}$ ), 41.85 (+,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ), 38.22 (+,  $\text{NCH}_3$ ). MS ( $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4$ , LC-MS, ESI)  $m/z$  (%): 419 [ $\text{MH}^+$ ] (100). Anal. ( $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4$ ) ber. : C 66,02; H 5,30; N 13,39; gef.: C 65,69; H 5,46; N 13,10.

### 9.4.4 Inhibitor mit Kopfgruppe 3

#### ***tert*-Butyl 4-((3-formyl-1*H*-indol-1-yl)methyl)benzoat (**41**)**

**C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub> (M = 335,15 g/mol)**

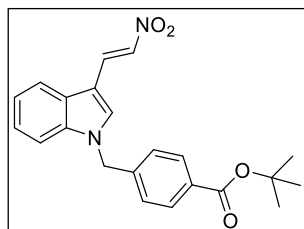


Darstellung wie für Verbindung **51** beschrieben, ausgehend von 1*H*-Indol-3-carbaldehyd (**40**) (9,60 g, 66,2 mmol) und *tert*-Butyl 4-(bromomethyl)benzoat (**21**) (18,0 g, 66,4 mmol). Extraktion (Ethylacetat) und SC (Ethylacetat / Petrolether (1:1)) ergaben einen beige farbenen Feststoff (18,2 g, 52,0 mmol; 78 %). Smp.: 112,7 - 114,9 °C. IR (KBr): 1704; 1664 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.95 (s, 1H, Aldehyd-H), 8.47 (s, 1H, Ar-H), 8.15 – 8.09 (m, 1H, Ar-H), 7.85 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.52 – 7.48 (m, 1H, Ar-H), 7.37 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.27 – 7.21 (m, 2H, Ar-H), 5.63 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar), 1.50 (s, 9H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 185.24 (+, OCH), 165.03 (quart. CO), 142.13 (quart. Ar-C), 141.54 (+, Ar-CH), 137.39 (quart. Ar-C), 131.28 (quart. Ar-C), 129.95 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 127.89 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 125.31 (quart. Ar-C), 124.17 (+, Ar-CH), 123.11 (+, Ar-CH), 121.60 (+, Ar-CH), 118.01 (quart. Ar-C), 111.81 (+, Ar-CH), 81.23 (quart. OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 50.01 (-, NCH<sub>2</sub>Ar), 28.20 (+, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). MS (C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 336 [MH<sup>+</sup>] (100). Anal. (C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub>) ber.: C 75,20; H 6,31; N 4,18; gef.: C 75,13; H 6,36; N 4,06.

#### ***tert*-Butyl (*E*)-4-((3-(2-nitrovinyl)-1*H*-indol-1-yl)methyl)benzoat (**42**)**

**C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M = 378,16 g/mol)**



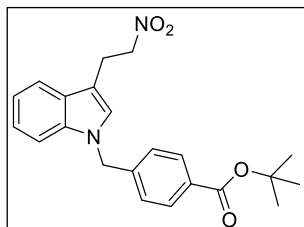
Die Darstellung erfolgte, wie für die Verbindung **52** beschrieben, ausgehend von *tert*-Butyl 4-((3-formyl-1*H*-indol-1-yl)methyl)benzoat (**41**) (10,0 g, 29,8 mmol). Durch das Einengen des LM auf die Hälfte und Abkühlen auf Raumtemperatur, präzipitierte der gelbe

Feststoff (11,17 g, 29,5 mmol; 99 %). Smp.: 144,2 – 146,7 °C. IR (KBr): 1714; 1619; 1320 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.26 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 7.96 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.83 – 7.78 (m, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.38 – 7.28 (m, 3H), 7.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.41 (s, 2H), 1.57 (s, 9H). MS (C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 379 [MH<sup>+</sup>] (100), 323

[MH<sup>+</sup>-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>] (71,63), 401 [MNa<sup>+</sup>] (49,98). Anal. (C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) ber.: C 69,83; H 5,86; N 7,40; gef.: C 69,64; H 5,95; N 7,33.

***tert*-Butyl 4-((3-(2-nitroethyl)-1*H*-indol-1-yl)methyl)benzoat (43)**

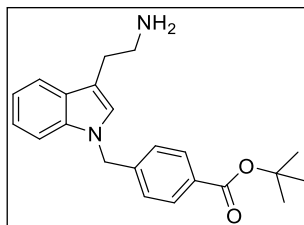
**C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M = 380,17 g/mol)**



Die Synthese erfolgte, wie für die Verbindung **53** beschrieben, ausgehend von (*E*)-*tert*-Butyl 4-((3-(2-nitrovinyl)-1*H*-indol-1-yl)methyl)benzoat (**42**) (0,5 g, 27,7 mmol). SC (DCM) ergab ein gelbes Öl (6,30 g, 16,6 mmol; 59 %). IR (KBr): 1707; 1549; 1312 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.95 – 7.88 (m, 2H), 7.61 – 7.56 (m, 1H), 7.23 – 7.12 (m, 3H), 7.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.99 (s, 1H), 5.32 (s, 2H), 4.67 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.50 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.56 (s, 9H). HRMS (C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, ESI-MS) *m/z*: ber.: 381,1809 [MH<sup>+</sup>], gef.: 381,1810 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 99,4 %, *t*<sub>R</sub> = 29,2 min.

***tert*-Butyl 4-((3-(2-aminoethyl)-1*H*-indol-1-yl)methyl)benzoat (44)**

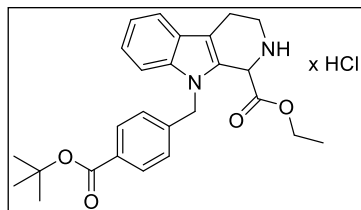
**C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M = 350,20 g/mol)**



Die Darstellung erfolgte, wie für die Verbindung **54** beschrieben, ausgehend von *tert*-Butyl 4-((3-(2-nitroethyl)-1*H*-indol-1-yl)methyl)benzoat (**43**) (6,0 g, 15,8 mmol). Waschen mit Diethylether ergab einen beige farbenen Feststoff (3,60 g, 10,3 mmol; 65 %). Smp.: 196,9 - 198,5 °C. IR (KBr): 1714; 1297 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.27 (s, 2H), 7.88 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.61 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.15 – 7.02 (m, 6H), 5.26 (s, 2H), 3.23 (br s, 4H), 1.54 (s, 9H). HRMS (C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ESI-MS) *m/z*: ber.: 351,2067 [MH<sup>+</sup>], gef.: 351,2071 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 99,7 %, *t*<sub>R</sub> = 12,1 min.

**Ethyl 9-(4-(*tert*-butoxycarbonyl)benzyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-1-carboxylat hydrochlorid (45)**

**C<sub>26</sub>H<sub>31</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M = 470,20 g/mol)**

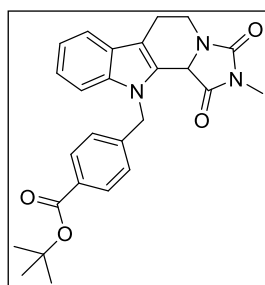


Die Synthese erfolgte gemäß der bei **55** beschriebenen Vorgehensweise ausgehend von *tert*-Butyl 4-((3-(2-aminoethyl)-1*H*-indol-1-yl)methyl)benzoat hydrochlorid (**44**) (3,50 g, 9,07 mmol). Aus einer gesättigten Methanol-Lösung

erhielt man dann durch tropfenweise Zugabe von Diethylether einen gelben Feststoff (2,45 g, 5,10 mmol; 56 %). Smp.: 211,2 - 214,9 °C. IR (KBr): 1747; 1714; 1297 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMF-*d*<sub>7</sub>): δ 15.64 (s, 2H), 13.32 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 13.10 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 12.75 – 12.60 (m, 5H), 11.33 (s, 1H), 11.16 (q, *J* = 17.5 Hz, 2H), 9.77 – 9.64 (m, 1H), 9.53 – 9.42 (m, 1H), 9.24 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 9.08 – 9.04 (m, 1H), 8.56 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 6.61 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). HRMS (C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, ESI-MS) *m/z*: ber.: 435,2278 [MH<sup>+</sup>], gef.: 435,2284 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 97,7 %, *t*<sub>R</sub> = 16,7 min.

***tert*-Butyl 4-((2-methyl-1,3-dioxo-1,2,3,5,6,11*b*-hexahydro-11*H*-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-*b*]indol-11-yl)methyl)benzoat (46)**

**C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (M = 445,20 g/mol)**



Die Darstellung erfolgte gemäß der bei **58** beschriebenen Vorgehensweise ausgehend von Ethyl 9-(4-(*tert*-butoxycarbonyl)benzyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-1-carboxylat hydrochlorid (**45**) (2,45 g, 5,10 mmol). SC (Ethylacetat) ergab einen farblosen Schaum (2,05 g, 4,60 mmol; 90 %).

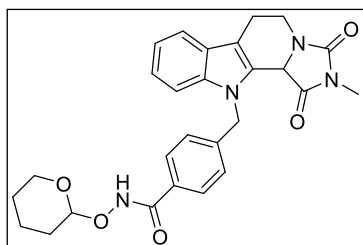
Smp.: 120,3 - 123,0 °C. IR (KBr): 1777; 1714; 1461 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.77 – 7.74 (m, 1H, Ar-H), 7.51 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.23 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.13 – 7.01 (m, 4H, Ar-H), 5.98 (d, *J* = 17.3 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>Ar), 5.77 (d, *J* = 17.2 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>Ar), 5.59 (s, 1H, OCCHC), 4.35 – 4.27 (m, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH<sub>2</sub>C), 3.14 – 3.05 (m, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH<sub>2</sub>C), 2.88 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.86 – 2.79 (m, 1H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 2.79 – 2.71 (m, 1H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 1.49 (s, 9H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 170.75 (quart. CO), 165.15 (quart. CO), 157.15 (quart. CO), 143.68 (quart. Ar-C), 137.41 (quart. Ar-C), 130.67 (quart. Ar-C), 129.78 (+, Ar-CH),

129.42 (+, Ar-CH), 127.56 (quart. Ar-C), 127.09 (+, Ar-CH), 126.99 (+, Ar-CH), 126.72 (quart. Ar-C), 122.81 (+, Ar-CH), 120.01 (+, Ar-CH), 119.10 (+, Ar-CH), 110.96 (+, Ar-CH), 110.17 (quart. Ar-C), 81.06 (quart. OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 57.05 (+, OCCHC), 48.01 (-, NCH<sub>2</sub>Ar), 38.51 (-, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C), 28.21 (+, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.38 (+, NCH<sub>3</sub>), 21.16 (-, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C). HRMS (C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, ESI-MS) *m/z*: ber.: 463,2340 [MNH<sub>4</sub><sup>+</sup>], gef.: 463,2334 [MNH<sub>4</sub><sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 95,1 %, *t<sub>R</sub>* = 26,2 min.

**4-((2-Methyl-1,3-dioxo-1,2,3,5,6,11*b*-hexahydro-11*H*-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-*b*]indol-11-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (48)**

**C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (M = 488,21 g/mol)**

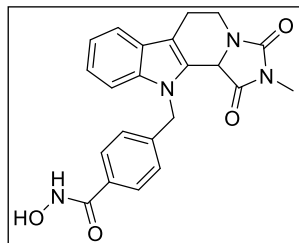


Die Synthese erfolgte gemäß der bei **60** beschriebenen Vorgehensweise ausgehend von 4-((2-Methyl-1,3-dioxo-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-*b*]indol-11(1*bH*)-yl)methyl)benzoesäure (**47**) (1,62 g, 4,16 mmol). **47** wurde als Rohprodukt aus *tert*-Butyl 4-((2-methyl-

1,3-dioxo-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-*b*]indol-11(1*bH*) yl)methyl)benzoat (**46**) analog der für **59** beschriebenen Synthese in quantitativer Ausbeute erhalten und ohne weitere Aufreinigung direkt weiter umgesetzt. SC (Ethylacetat) ergab einen gelben Schaum (0,86 g, 1,76 mmol; 42 %). IR (KBr): 2946; 1713;1463, cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.65 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.55 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.21 (d, *J* = 3.6 Hz, 2H), 7.19 – 7.11 (m, 1H), 7.02 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 6.13 (d, *J* = 17.2 Hz, 1H), 5.64 (d, *J* = 17.1 Hz, 1H), 5.08 (d, *J* = 16.0 Hz, 2H), 4.52 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 4.02 – 3.88 (m, 1H), 3.63 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 3.03 (s, 3H), 3.01 – 2.98 (m, 1H), 2.96 – 2.83 (m, 2H), 1.73 (d, *J* = 76.3 Hz, 6H). HRMS (C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>, ESI-MS) *m/z*: ber.: 489,2132 [MH<sup>+</sup>], gef.: 489,2135 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 95,1 %, *t<sub>R</sub>* = 12,5 min.

***N*-Hydroxy-4-((2-methyl-1,3-dioxo-1,2,3,5,6,11*b*-hexahydro-11*H*-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-*b*]indol-11-yl)methyl)benzamid (49)**

**C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (M = 404,15 g/mol)**



Die Synthese erfolgte gemäß der bei **61** beschriebenen Vorgehensweise ausgehend von 4-((2-Methyl-1,3-dioxo-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-*b*]indol-11(11*bH*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (**48**) (0,50 g,

1,02 mmol). Durch das Ansäuern der Lösung mit 0,6 N HCl<sub>(iprop)</sub>-Lösung fiel ein rötlicher Feststoff aus (0,225 g, 0,56 mmol; 55 %). Smp.: 134,5 - 136,9 °C. IR (KBr): 1710; 1462 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.15 (s, 1H, NHOH), 9.03 (s, 1H, NHOH), 7.64 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.52 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.27 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.14 – 7.09 (m, 1H, Ar-H), 7.08 – 7.03 (m, 3H, Ar-H), 6.00 (d, *J* = 17.2 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>Ar), 5.74 (d, *J* = 17.1 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>Ar), 5.65 (s, 1H, OCCHC), 4.36 – 4.26 (m, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH<sub>2</sub>C), 3.17 – 3.05 (m, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH<sub>2</sub>C), 2.90 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.85 – 2.72 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C).

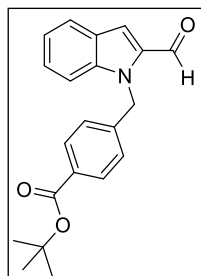
<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 170.79 (quart. CO), 164.46 (quart. CO), 156.79 (quart. CO), 141.61 (quart. Ar-C), 137.38 (quart. Ar-C), 132.17 (quart. Ar-C), 127.59 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 127.55 (quart. Ar-C), 126.84 (+, Ar-CH), 126.70 (quart. Ar-C), 122.79 (+, Ar-CH), 119.98 (+, Ar-CH), 119.11 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 111.02 (+, Ar-CH), 110.09 (quart. Ar-C), 57.09 (+, OCCHC), 47.95 (-, NCH<sub>2</sub>Ar), 38.54 (-, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C), 25.40 (+, NCH<sub>3</sub>), 21.16 (-, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C). HRMS (C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>, ESI-MS) *m/z*: ber.: 405,1557 [MH<sup>+</sup>], gef.: 405,1559 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 95,6 %, *t<sub>R</sub>* = 12,5 min.



## 9.4.5 Inhibitor mit Kopfgruppe 4

### *tert*-Butyl 4-((2-formyl-1*H*-indol-1-yl)methyl)benzoate (**51**)

C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub> (M = 335,15 g/mol)

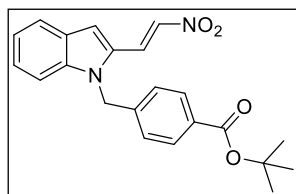


Darstellung erfolgte gemäß **AV5a** ausgehend von 1*H*-Indol-2-carbaldehyd (**50**) und *tert*-Butyl 4-(bromomethyl)benzoat (**21**). Extraktion (Diethylether; 4 x 250,0 mL) und SC (DCM / Petrolether 1:1) ergaben einen gelben Feststoff (27,16 g, 80,98 mmol; 64 %). Smp.: 131,7 - 133,1 °C. IR (KBr): 2972; 2802; 1709; 1671 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.91 (s, 1H, Aldehyd-H), 7.81 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.78 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.59 (s, 1H, Ar-H), 7.56 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.40 – 7.35 (m, 1H, Ar-H), 7.20 – 7.15 (m, 1H, Ar-H), 7.12 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 5.90 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar), 1.48 (s, 9H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 184.13 (+, OCH), 165.09 (quart. COOCH<sub>3</sub>), 143.68 (quart. Ar-C), 140.45 (quart. Ar-C), 135.54 (quart. Ar-C), 130.71 (quart. Ar-C), 129.78 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 127.56 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 126.94 (+, Ar-CH), 126.58 (quart. Ar-C), 123.93 (+, Ar-CH), 121.67 (+, Ar-CH), 118.75 (+, Ar-CH), 111.78 (+, Ar-CH), 81.08 (+, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 47.39 (-, NCH<sub>2</sub>Ar (Benzyl)), 28.20 (+, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). MS (C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 280 [MH<sup>+</sup>-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>] (100), 336 [MH<sup>+</sup>] (14,35), 358 [MNa<sup>+</sup>] (49,37). Anal. (C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub>) ber.: C 75,20; H 6,31; N 4,18; gef.: C 75,02; H 6,30; N 4,12.

### (*E*)-*tert*-Butyl 4-((2-(2-nitrovinyl)-1*H*-indol-1-yl)methyl)benzoate (**52**)

C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M = 378,16 g/mol)



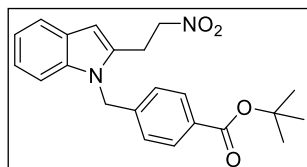
Die Synthese wurde modifiziert nach Lit.<sup>84</sup>. Die Lösung bestehend aus (*E*)-*tert*-Butyl 4-((2-(2-nitrovinyl)-1*H*-indol-1-yl)methyl)benzoat (**51**) (24,55 g; 73,20 mmol) und Ammoniumacetat (2,82 g, 36,6 mmol) in Nitromethan (250 mL) wurde unter

Stickstoffatmosphäre für 10 Std refluxiert. Durch das Einengen des LM auf die Hälfte und Abkühlen auf Raumtemperatur, präzipitierte das Produkt als Feststoff. Kristallisation (EtOH) ergab einen gelben Feststoff (17,50 g, 46,2 mmol; 63 %). Smp.: 196,3 - 199,5 °C. IR (KBr): 2999; 2975; 1704; 1632 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.03 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.70 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 7.37 – 7.28 (m, 2H),

7.22 – 7.16 (m, 2H), 7.04 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 5.53 (s, 2H), 1.56 (s, 9H). MS ( $C_{22}H_{22}N_2O_4$ , LC-MS, ESI)  $m/z$  (%): 323 [ $MH^+ - C_4H_8$ ] (68,57), 379 [ $MH^+$ ] (6,75), 401 [ $MNa^+$ ] (100). Anal. ( $C_{22}H_{22}N_2O_4$ ) ber.: C 69,83; H 5,86; N 7,40, gef.: C 69,86; H 5,90; N 7,29.

***tert*-Butyl 4-((2-(2-nitroethyl)-1*H*-indol-1-yl)methyl)benzoate (**53**)**

$C_{22}H_{24}N_2O_4$  (M = 380,17 g/mol)

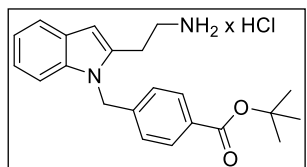


Die Synthese erfolgte in Anlehnung an Lit.:<sup>86,87</sup>

Zu einer Lösung aus (*E*)-*tert*-Butyl 4-((2-(2-nitrovinyl)-1*H*-indol-1-yl)methyl)benzoat (**52**) (15,0 g; 39,7 mmol) in  $CHCl_3$  (750 mL) und Isopropanol (75 mL) wurden Kieselgel (75 g) und  $NaBH_4$  (47,6 mmol, 1,80 g) hinzugegeben und die Mischung bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde durch tropfenweise Zugabe von  $H_2O$  (100 mL) gestoppt, die Mischung über Celite abfiltriert und über  $Na_2SO_4$  getrocknet. SC (DCM) ergab einen gelben Feststoff (11,18 g, 29,4 mmol; 74 %). Smp.: 150,4 - 152,2 °C. IR (KBr): 3000; 2978; 1704; 1555  $cm^{-1}$ .  $^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.94 – 7.87 (m, 2H), 7.60 (dd,  $J = 6.5, 1.7$  Hz, 1H), 7.23 – 7.09 (m, 3H), 6.98 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 6.41 (s, 1H), 5.40 (s, 2H), 4.63 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 3.38 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.56 (s, 9H). MS ( $C_{22}H_{24}N_2O_4$ , LC-MS, ESI)  $m/z$  (%): 325 [ $MH^+ - C_4H_8$ ] (11,84), 381 [ $MH^+$ ] (100), 403 [ $MNa^+$ ] (50,07). Anal. ( $C_{22}H_{24}N_2O_4$ ) ber.: C 69,46; H 6,36; N 7,36; gef.: C 69,27; H 6,34; N 7,19.

***tert*-Butyl 4-((2-(2-aminoethyl)-1*H*-indol-1-yl)methyl)benzoat hydrochlorid (**54**)**

$C_{22}H_{27}ClN_2O_2$  (M = 386,18 g/mol)

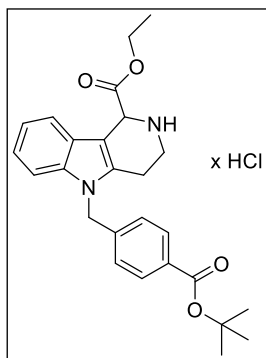


Die Synthese erfolgte nach einer Modifikation von **AV1** und der Lit.:<sup>59</sup> *tert*-Butyl 4-((2-(2-nitroethyl)-1*H*-indol-1-yl)methyl)benzoat (**53**) (10,80 g, 28,4 mmol) wurde in HOAc (108 mL) gelöst und Zn-Staub (170 mmol, 1,13 g) in kleinen Portionen bei Raumtemperatur hinzugefügt. Nach Reaktionsende (4 Std, DC-Kontrolle) wurde Eis (250 g) hinzugegeben, die Mischung vorsichtig mit 25 %  $NH_3(aq)$  alkalisiert (pH = 14) und mit Ethylacetat extrahiert (3 x 100 mL). Der entstandene Rückstand wurde in THF (10 mL) gelöst, auf 0 °C gekühlt und durch tropfenweise Zugabe von HCl (5-6 N in  $i$ Prop.) angesäuert (pH = 2). Durch Zugabe von Diethylether präzipitiert das Hydrochlorid. Waschen mit Diethylether ergab einen Feststoff (9,60 g, 24,8 mmol; 84 %). Smp.: 208,9 - 210,2 °C. IR (KBr): 2972; 2361; 1718; 1295  $cm^{-1}$ .

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.86 (s, 2H), 7.82 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.54 (d,  $J = 6.7$  Hz, 1H), 7.35 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.10 – 6.99 (m, 4H), 6.46 (s, 1H), 5.54 (s, 2H), 3.13 – 3.07 (m, 2H), 3.03 – 2.95 (m, 2H), 1.51 (s, 9H). MS ( $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2$ , LC-MS, ESI)  $m/z$  (%): 351 [ $\text{MH}^+$ ] (100). Anal. ( $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{ClN}_2\text{O}_2$ ) ber.: C 68,29; H 7,03; N 7,24; gef.: C 68,08; H 7,06; N 7,03.

**Ethyl 5-(4-(*tert*-butoxycarbonyl)benzyl)-2,3,4,5-tetrahydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]indol-1-carboxylat hydrochlorid (55)**

$\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{ClN}_2\text{O}_4$  ( $M = 470,20$  g/ml)



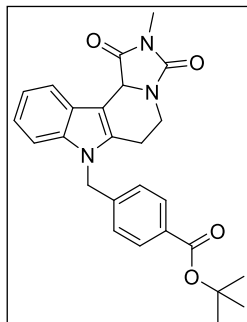
Zu einer Lösung bestehend aus *tert*-Butyl 4-((2-(2-aminoethyl)-1*H*-indol-1-yl)methyl)benzoat hydrochlorid (**54**) (9,00 g, 23,3 mmol) in MeOH (200,0 mL) wurden Ethylglyoxalat (5,56 mL; 50 % in Toluol) und Kieselgel (18,0 g) hinzugegeben und für 1 Std bei Raumtemperatur gerührt. SC (DCM / MeOH /  $\text{NH}_3$  (25 %), 10:1:0.1) („dry load“-Methode) ergab einen gelben Schaum (9,90 g, 21,02 mmol; 90 %); IR (KBr): 2978; 2931; 1733; 1712  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$

7.92 – 7.86 (m, 2H, Ar-H), 7.79 – 7.73 (m, 1H, Ar-H), 7.21 – 7.08 (m, 3H, Ar-H), 7.07 – 7.00 (m, 2H, Ar-H), 5.36 – 5.21 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.94 (br s, 1H, NHCH), 4.33 – 4.13 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>H<sub>3</sub>), 3.53 – 3.42 (m, 1H, NCCH<sub>2</sub>CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 3.29 – 3.18 (m, 1H, NCCH<sub>2</sub>CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 2.80 – 2.58 (m, 2H, NCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.38 (s, 1H, NH), 1.56 (s, 9H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.32 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  178.93 (quart. CO), 165.44 (quart. CO), 146.28 (quart. Ar-C), 144.00 (quart. Ar-C), 136.75 (quart. Ar-C), 130.19 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 130.07 (+, Ar-CH), 126.05 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 121.93 (+, Ar-CH), 121.42 (quart. Ar-C), 120.01 (+, Ar-CH), 119.73 (+, Ar-CH), 108.91 (quart. Ar-C), 106.59 (quart. Ar-C), 81.27 (quart. OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 61.99 (-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 53.71 (-, NCH<sub>2</sub>Ar), 51.86 (+, NCH), 46.48 (-, NCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 39.68(-, NCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.16 (+, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 14.46 (+, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). HRMS ( $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4$ , ESI-MS)  $m/z$ : ber.: 435,2278 [ $\text{MH}^+$ ], gef.: 435,2285 [ $\text{MH}^+$ ]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 95,0 %,  $t_R = 12,5$  min.

***tert*-Butyl 4-((2-methyl-1,3-dioxo-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*-imidazo[1',5':1,2]pyrido[4,3-*b*]indol-7(11*cH*)-yl)methyl)benzoat (58)**

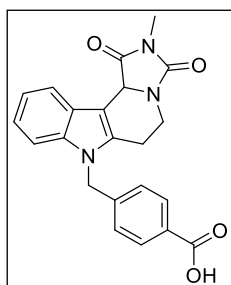
**C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (M = 445,20 g/mol)**



Die Darstellung erfolgte gemäß **AV3**. Ethyl 5-(4-(*tert*-Butoxycarbonyl)benzyl)-2,3,4,5-tetrahydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]indol-1-carboxylat (**55**) (3,00 g, 6,90 mmol) wird in Acetonitril (15,0 mL) gelöst. Die Reaktion wird nach Zugabe von Diisopropylethylamin (3,0 mL) und *N*-succinimidyl-*N*-methyl-carbamat (1,31 g, 7,60 mmol) für 16 Std bei Raumtemperatur gerührt. Extraktion (Ethylacetat) (3 x 50 mL) und SC (DCM / Ethylacetat (10:1)) ergaben einen farblosen Schaum (1,44 g, 3,23 mmol; 47 %). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.12 – 8.01 (m, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.19 – 7.08 (m, 3H), 6.96 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 5.36 – 5.32 (m, 1H), 5.24 (s, 2H), 4.48 (dd, *J* = 13.7, 6.0 Hz, 1H), 3.20 – 3.05 (m, 1H), 2.97 (s, 3H), 2.88 – 2.71 (m, 1H), 2.56 (dd, *J* = 16.0, 4.7 Hz, 1H), 1.51 (s, 9H).

**4-((2-Methyl-1,3-dioxo-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*-imidazo[1',5':1,2]pyrido[4,3-*b*]indol-7(11*cH*)-yl)methyl)benzoesäure (59)**

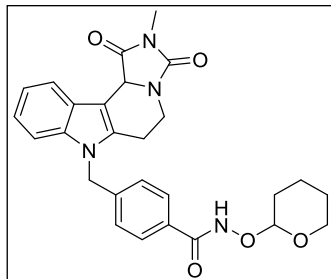
**C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (M = 389,14 g/mol)**



Synthese nach **AV6** ausgehend von *tert*-Butyl 4-((2-methyl-1,3-dioxo-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*-imidazo[1',5':1,2]-pyrido[4,3-*b*]indol-7(11*cH*)-yl)methyl)benzoat (**58**) (1,00 g, 2,24 mmol). Durch Verdünnung der TFA-Lösung mit H<sub>2</sub>O (1:10) kristallisiert ein gelber Feststoff aus (0,83 g, 2,12 mmol; 95 %). Smp.: 267,2 - 269,6 °C. IR (KBr): 1757; 1717; 1678 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.91 (s, 1H), 7.94 – 7.89 (m, 1H), 7.86 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.43 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.13 – 7.05 (m, 2H), 5.54 – 5.50 (m, 1H), 5.46 (s, 2H), 4.33 (dd, *J* = 13.6, 4.9 Hz, 1H), 3.28 – 3.15 (m, 2H), 2.86 (s, 3H), 2.80 – 2.75 (m, 1H). HRMS (C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, ESI-MS) *m/z*: ber.: 407,1714 [MNH<sub>4</sub><sup>+</sup>], gef.: 407,1714[MNH<sub>4</sub><sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 97,5 %, *t<sub>R</sub>* = 14,8 min.

**4-((2-Methyl-1,3-dioxo-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*-imidazo[1',5':1,2]pyrido[4,3-*b*]indol-7(11*cH*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (**60**)**

**C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (M = 488,21 g/mol)**



Darstellung gemäß **AV7** ausgehend von 4-((2-Methyl-1,3-dioxo-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*-imidazo[1',5':1,2]-pyrido-[4,3-*b*]indol-7(11*cH*)-yl)methyl)benzoesäure (**59**) (0,78 g, 2,00 mmol).

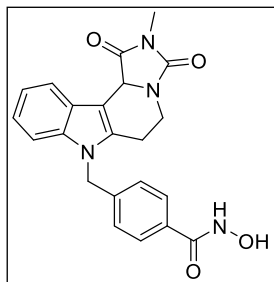
Extraktion (Ethylacetat) (3 x 50 mL) und SC (DCM / MeOH (10:1)) ergaben einen farblosen Schaum (0,97 g, 1,98 mmol; 99 %).

Smp.: 184,7 - 186,9 °C. IR (KBr): 2950; 1706; 1464 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.58 (s, 1H), 7.91 (dd, *J* = 6.6, 2.1 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.43 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.16 – 7.04 (m, 4H), 5.54 – 5.50 (m, 1H), 5.44 (s, 2H), 4.95 (s, 1H), 4.33 (dd, *J* = 13.5, 5.1 Hz, 1H), 3.49 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H), 3.28 – 3.14 (m, 1H), 2.87 (s, 3H), 2.76 (d, *J* = 17.0 Hz, 2H), 2.09 – 2.08 (m, 1H), 1.72 – 1.50 (m, 6H). HRMS (C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>, ESI-MS) *m/z*: ber.: 489,2132 [MH<sup>+</sup>], gef.: 489,2133 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 95,0 %, *t*<sub>R</sub> = 8,1 min.

***N*-Hydroxy-4-((2-methyl-1,3-dioxo-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*-imidazo[1',5':1,2]pyrido[4,3-*b*]indol-7(11*cH*)-yl)methyl)benzamid (**61**)**

**C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (M = 404,15 g/mol)**



Die Freisetzung der Hydroxamsäure erfolgte gemäß **AV8** ausgehend von 4-((2-Methyl-1,3-dioxo-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*-imidazo[1',5':1,2]pyrido[4,3-*b*]indol-7(11*cH*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (**60**). Das Lösungsmittel wurde abgezogen und der Rückstand umkristallisiert (EtOH). Man erhielt einen gelben Feststoff

(0,32 g, 0,79 mmol; 40 %). Smp.: 248,1 - 251,7 °C. IR (KBr): 3251; 1769; 1690; 1650 cm<sup>-1</sup>.

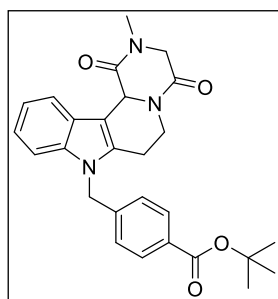
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.12 (s, 1H, NHOH), 8.98 (s, 1H, NHOH), 7.92 – 7.88 (m, 1H, Ar-H), 7.64 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.42 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.14 – 7.04 (m, 4H, Ar-H), 5.50 (s, 1H, NCHC), 5.41 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.38 - 4.26 (m, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH<sub>2</sub>), 3.25 – 3.15 (m, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH<sub>2</sub>), 2.86 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.81 – 2.73 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 171.92 (quart. CO), 164.39 (quart. CO), 157.17 (quart. CO), 141.53 (quart. Ar-C), 136.77 (quart. Ar-C), 134.41 (quart. Ar-C), 132.36 (quart. Ar-C),

127.76 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 126.95 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 124.85 (quart. Ar-C), 122.00 (+, Ar-CH), 120.44 (+, Ar-CH), 120.01 (+, Ar-CH), 110.28 (+, Ar-CH), 103.24 (quart. Ar-C), 57.27 (+, NCHC), 45.96 (-, NCH<sub>2</sub>Ar), 37.08 (-, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 25.03 (+, NCH<sub>3</sub>), 21.76 (-, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>). HRMS (C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>, ESI-MS) *m/z*: ber.: 405,1557 [MH<sup>+</sup>], gef.: 405,1558 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 96,8 %, *t<sub>R</sub>* = 10,8 min.

## 9.4.6 Inhibitor mit Kopfgruppe 5

***tert*-Butyl 4-((2-methyl-1,4-dioxo-1,3,4,6,7,12*c*-hexahydropyrazino[1',2':1,2]pyrido[4,3-*b*]indol-8(2*H*)-yl)methyl)benzoate (62)**  
 C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (M = 459,22 g/mol)



Synthese in Anlehnung an die Lit.<sup>90,91</sup> Ethyl 5-(4-(*tert*-butoxycarbonyl)benzyl)-2,3,4,5-tetrahydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]indol-1-carboxylat hydrochlorid (**55**) (3,55 g, 7,54 mmol) wurde in DCM (50 mL) gelöst und auf -50 °C gekühlt. Chloroacetylchlorid (0,68 mL, 8,57 mmol) und Diisopropylethylamin (1,55 mL, 8,98 mmol) wurden hinzugegeben und innerhalb von 1 Std auf 0 °C gebracht.

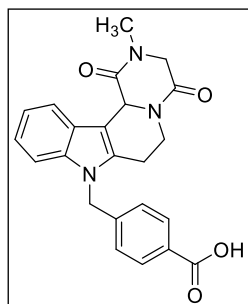
Das LM wurde im Ölpumpenvakuum (0 °C) abgezogen. Nach anschließender Zugabe von Methylamin (30 mL, 40 % in Methanol) wurde der Reaktionsansatz über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Extraktion (Ethylacetat) und zweifache Säulenchromatographie (1. Ethylacetat pur; 2. Ethylacetat / Acetonitril (1:1)) ergaben einen gelben Schaum (2,40 g, 5,22 mmol; 69 %). Smp.: 121,1 - 124,0 °C; IR (KBr): 1712; 1669 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.91 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.83 – 7.79 (m, 2H, Ar-H), 7.36 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.13 – 7.09 (m, 2H, Ar-H), 7.09 – 6.94 (m, 2H, Ar-H), 5.57 (s, 1H, NCHC), 5.53 – 5.37 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.67 – 4.58 (m, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CO), 4.14 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 3.95 (d, *J* = 17.7 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 3.04 – 2.95 (m, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CO), 2.89 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.81 – 2.74 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C), 1.49 (s, 9H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 165.77 (quart. CO), 165.09 (quart. CO), 164.59 (quart. CO), 143.62 (quart. Ar-C), 136.80 (quart. Ar-C), 135.47 (quart. Ar-C), 130.79 (quart. Ar-C), 129.90 (+, Ar-CH), 127.00 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 125.29 (+, Ar-CH), 125.71 (quart. Ar-C), 121.47 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 119.61 (+, Ar-CH), 109.87 (+, Ar-CH), 105.85 (quart. Ar-C), 81.12 (quart. OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 56.85 (+, NCHC), 51.54 (-, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C), 45.80 (-, NCH<sub>2</sub>Ar), 39,95 (-, NCH<sub>2</sub>CO), 33.40 (+, NCH<sub>3</sub>), 28.21 (+, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 21.54 (-, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C). HRMS (C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, ESI-MS)

$m/z$ : ber.: 482,2050 [MNa<sup>+</sup>], gef.: 482,2055[MNa<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 95,1 %,  $t_R$  = 22,3 min.

**4-((2-Methyl-1,4-dioxo-1,3,4,6,7,12c-hexahydropyrazino[1',2':1,2]pyrido[4,3-*b*]indol-8(2*H*)-yl)methyl)benzoesäure (63)**

**C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (M = 403,15 g/mol)**

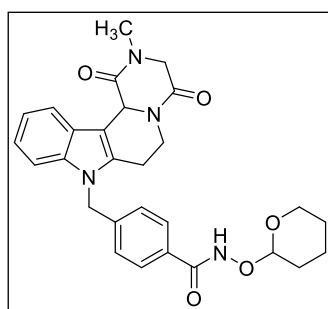


Synthese gemäß **AV6** ausgehend von einer Lösung von *tert*-Butyl 4-((2-methyl-1,4-dioxo-1,3,4,6,7,12c-hexahydropyrazino[1',2':1,2]pyrido[4,3-*b*]indol-8(2*H*)-yl)methyl)benzoat (**62**) (0,46 g, 1,00 mmol) in DCM (20 mL). Reaktionszeit 16 Std bei Raumtemperatur. Extraktion aus H<sub>2</sub>O / TFA (4:1) mit DCM ergab einen braunen Feststoff (0,40 g, 0,99 mmol; 99 %). Smp.: 283,3 - 287,4 °C. IR (KBr): 2360; 1700;

1669 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.75 (s, 1H), 7.91 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.38 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.12 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.10 – 6.96 (m, 2H), 5.59 (s, 1H), 5.55 – 5.38 (m, 2H), 4.63 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H), 4.16 (d, *J* = 17.7 Hz, 1H), 3.96 (d, *J* = 17.7 Hz, 1H), 3.06 – 2.94 (m, 1H), 2.90 (s, 3H), 2.80 (s, 2H). HRMS (C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, ESI-MS)  $m/z$ : ber.: 426,1424 [MNa<sup>+</sup>], gef.: 426,1427 [MNa<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 99,2 %, 11,3 min.

**4-((2-Methyl-1,4-dioxo-1,3,4,6,7,12c-hexahydropyrazino[1',2':1,2]pyrido[4,3-*b*]indol-8(2*H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (64)**

**C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (M = 502,22 g/mol)**



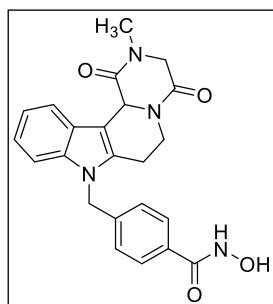
In Anlehnung an **AV7** wurde die Verbindung 4-((2-Methyl-1,4-dioxo-1,3,4,6,7,12c-hexahydropyrazino[1',2':1,2]pyrido[4,3-*b*]indol-8(2*H*)-yl)methyl)benzoesäure (**63**) (0,31 g, 0,77 mmol) in THF (60 mL) gelöst und für 3,5 Std bei Raumtemperatur gerührt. (DC-Kontrolle). Anschließend erfolgte die Extraktion (Ethylacetat) und das Einengen des Lösungsmittels

bis zur Kristallisation. Waschen mit Diethylether lieferte den gewünschten Feststoff (0,22 g, 0,44 mmol; 57 %). Smp.: 188,7 - 192,8 °C. IR (KBr): 2360; 1675; 1653 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.58 (s, 1H), 7.91 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.38 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.07 – 6.95 (m, 2H), 5.59 (br s, 1H), 5.54 – 5.34 (m, 2H), 4.98 – 4.92 (m, 1H), 4.63 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H), 4.16 (d, *J* = 17.7 Hz, 1H), 4.03 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.96 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H), 3.49 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 3.06 – 2.94 (m, 1H),

2.89 (s, 3H), 2.81 (s, 2H), 1.74 – 1.50 (m, 6H). HRMS (C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>, ESI-MS) *m/z*: ber.: 503,2289 [MH<sup>+</sup>], gef.: 503,2289 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 96,2 %, 12,6 min.

***N*-Hydroxy-4-((2-methyl-1,4-dioxo-1,3,4,6,7,12c-hexahydropyrazino[1',2':1,2]pyrido[4,3-*b*]indol-8(2*H*)-yl)methyl)benzamid (65)**

**C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (M = 418,16 g/mol)**



Darstellung in Anlehnung an **AV8**. 4-((2-Methyl-1,4-dioxo-1,3,4,6,7,12c-hexahydropyrazino[1',2':1,2]pyrido[4,3-*b*]indol-8(2*H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (**64**) (0,18 g, 0,36 mmol) wurde in einer Mischung aus Methanol (20 mL), Tetrahydrofuran (20 mL) und DCM (20 mL) gelöst. Diese Mischung wurde nach Zugabe von 6 N HCl<sub>(i</sub>prop) (0,2 mL) für 45 min bei

Raumtemperatur gerührt (DC-Kontrolle: DCM / MeOH (10:1)). Das LM wurde unter reduziertem Druck abgezogen, EtOH hinzugegeben und die Lösung für 15 min auf 70 °C erhitzt. Ein leicht beige farbener Feststoff konnte beim Abkühlen auf Raumtemperatur abfiltriert werden (0,12 g, 0,29 mmol; 80 %). Smp.: 204,1 - 205,6 °C. IR (KBr): 2360; 1677; 1653 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.14 (s, 1H, NHOH), 8.99 (s, 1H, NHOH), 7.89 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.65 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.37 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.07 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, Ar-H), 7.05 – 6.95 (m, 2H, Ar-H), 5.58 (s, 1H, NCHC), 5.48 – 5.35 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar (Benzyl)), 4.67 – 4.57 (m, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CO), 4.15 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 3.94 (d, *J* = 17.7 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 3.05 – 2.96 (m, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CO), 2.89 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.83 – 2.77 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C).

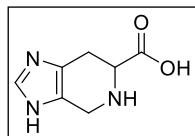
<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 165.79 (quart. CO), 164.63 (quart. CO), 164.41 (quart. CO), 141.69 (quart. Ar-C), 136.77 (quart. Ar-C), 135.44 (quart. Ar-C), 132.31 (quart. Ar-C), 127.75 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 126.84 (+, Ar-CH), 125.29 (+, Ar-CH), 125.72 (quart. Ar-C), 121.47 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 119.58 (+, Ar-CH), 109.92 (+, Ar-CH), 105.75 (quart. Ar-C), 56.81 (+, NCHC), 51.56 (-, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C), 45.74 (-, NCH<sub>2</sub>Ar), 39.66 (-, NCH<sub>2</sub>CO), 33.41 (+, NCH<sub>3</sub>), 21.57 (-, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C). HRMS (C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>, ESI-MS) *m/z*: ber.: 419,1714 [MH<sup>+</sup>], gef.: 419,1715 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 97,8 %, *t*<sub>R</sub> = 7,4 min.



### 9.4.7 Inhibitor mit Kopfgruppe 6

#### 4,5,6,7-Tetrahydro-3*H*-imidazo[4,5-*c*]pyridin-6-carbonsäure (**76**)

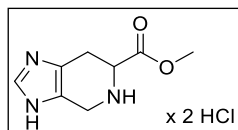
$C_7H_9N_3O_2$  (M = 167,07 g/mol)



Die Synthese erfolgte analog zu der in der Lit.<sup>101</sup> beschriebene Synthese. Zu einer Lösung aus *D, L*-Histidin monohydrochlorid monohydrat (**75**) (2,0 g, 9,54 mmol) in  $H_2O$  (20,0 mL) wurden 2 eq Formaldehyd (36 % in  $H_2O$ ) hinzugegeben und die Mischung bei 95 °C für 24 Std gerührt. Das LM wurde vollständig mittels einer Vakuum-Pumpe abgezogen. Nach dem Trocknen erhielt man einen Feststoff (0,37 g, 0,71 mmol; 97 %).  $^1H$ -NMR (300 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  8.57 (s, 1H), 4.44 (d,  $J$  = 15.5 Hz, 1H), 4.32 – 4.25 (m, 1H), 4.08 (dd,  $J$  = 10.4, 5.5 Hz, 1H), 3.29 (dd,  $J$  = 17.0, 5.5 Hz, 1H), 3.10 – 2.96 (m, 1H). Lit.<sup>101</sup>:  $^1H$ -NMR (300 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  8.30 (m, 1 H), 4.35 (m, 2 H), 3.20–3.40 (m, 2 H).

#### Methyl 4,5,6,7-tetrahydro-3*H*-imidazo[4,5-*c*]pyridin-6-carboxylat dihydrochlorid (**77**)

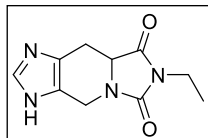
$C_8H_{13}Cl_2N_3O_2$  (M = 253,04 g/mol)



Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die Lit.<sup>103</sup> (4,5,6,7-Tetrahydro-3*H*-imidazo[4,5-*c*]pyridin-6-carbonsäure (**76**) (1,57 g, 9,39 mmol)) wurde in MeOH gelöst und das Reaktionsgemisch auf 0 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur erfolgte die vorsichtige und tropfenweise Zugabe von Thionylchlorid (2 eq). Im Anschluss wurde die Lösung über Nacht refluxiert (Badtemperatur, 95 °C). Das LM wurde unter reduziertem Druck entfernt und die Substanz ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt. Man erhielt einen Feststoff (1,50 g, 6,89 mmol; 73 %).  $^1H$ -NMR (300 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  9.04 (s, 1H), 4.70 (dd,  $J$  = 9.7, 5.5 Hz, 1H), 4.33 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.30 (dd,  $J$  = 16.3, 5.3 Hz, 1H), 3.20 – 3.13 (m, 1H). Lit.<sup>103</sup>:  $^1H$ -NMR ( $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  12.65 (br s, 2H), 9.04 (s, 1H), 4.71 (m, 1H), 4.33 (t,  $J$  = 16.2 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.33–3.10 (m, 2H).

**7-Ethyl-3,4,8a,9-tetrahydro-6H-diimidazo[1,5-a:4'.5'-d]pyridin-6,8(7H)-dion  
hydrochlorid (78)**

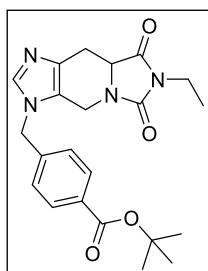
**C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (M = 220,10 g/mol)**



In Anlehnung an die Lit.<sup>105</sup> wurde ein Reaktionsgemisch bestehend aus Ethylisocyanat (6,89 mmol), Methyl 4,5,6,7-tetrahydro-3H-imidazo[4,5-c]pyridin-6-carboxylat hydrochlorid (**77**) (1,5 g, 6,89 mmol) und Triethylamin (6,89 mmol) in DMF (15 mL) hergestellt und für 24 Std auf 60 °C erhitzt. SC (DCM / MeOH (10:1)) ergab ein gelbes Öl (0,16 g, 0,73 mmol; 11 %). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.01 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 4.63 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H), 4.38 (dd, *J* = 10.8, 5.6 Hz, 1H), 4.14 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H), 3.44 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.99 (dd, *J* = 14.5, 5.6 Hz, 1H), 2.78 – 2.64 (m, 1H), 1.11 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). Lit.<sup>105</sup>: <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.59 (s, 1H), 4.64 (d, 1H, *J* = 15.2 Hz.), 4.38 (dd, 1H, *J* = 11.0 Hz., *J* = 6.0 Hz.), 4.14 (d, 1H, *J* = 15.2 Hz.), 3.44 (q, 2H, *J* = 7.0 Hz.), 2.99 (dd, 1H, *J* = 14.6 Hz., *J* = 6.0 Hz.), 2.71 (dd, 1H, *J* = 14.6 Hz., *J* = 6.0 Hz.), 1.04 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz.).

***tert*-Butyl 4-((7-ethyl-6,8-dioxo-4,6,7,8,8a,9-hexahydro-3H-diimidazo[1,5-*a*:4'.5'-*d*]pyridin-3-yl)methyl)benzoate (**79a**)**

**C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (M = 410,20 g/mol)**



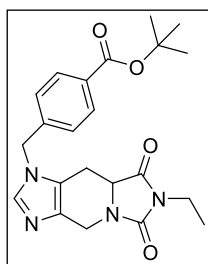
Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an **AV5b**. Es wurde eine Mischung bestehend aus 7-Ethyl-3,4,8a,9-tetrahydro-6H-diimidazo[1,5-*a*:4'.5'-*d*]pyridin-6,8(7H)-dion hydrochlorid (**78**) (4,00 g, 18,16 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3,5 eq, 8,78 g) und Alkylans **21** (1,5 eq, 7,39 g) in wasserfreiem 2-Butanon (400 mL) für 24 Std bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Umsetzung (DC-Kontrolle) gerührt. Das K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> wurde abfiltriert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt mittels dreimaliger Säulenchromatographie gereinigt (Ethylacetat / MeOH (5:1)), um **79a** von **79b** durch sukzessive Anreicherung voneinander zu trennen. Kristallisation (Ethylacetat) ergab einen Feststoff (0,75 g, 2,92 mmol; 16 %). Smp.: 165,0 - 165, 5 °C. IR (KBr): 3102; 2986; 1711 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.90 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar-H<sub>A/A'</sub>), 7.80 (br s, 1H, NCHN), 7.31 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar-H<sub>B/B'</sub>), 5.31 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>-Ar(Benzyl)), 4.59 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H, OCNCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 4.30 (dd, *J* = 10.9, 5.5 Hz, 1H, NCOCH), 3.92 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H, OCNCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 3.40 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.90 (dd, *J* = 14.9, 5.4 Hz, 1H,

OCCHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 2.63 (dd,  $J = 14.9, 5.4$  Hz, 1H, OCCHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 1.53 (s, 9H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.07 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  172.57 (quart. CO), 165.05 (quart. CO), 154.92 (quart. CO), 142.02 (quart. Ar-C), 138.26 (+, NCHN), 132.98 (quart. Ar-C), 131.31 (quart. Ar-C), 130.04 (+, Ar-CH<sub>A+A'</sub>), 127.94 (+, Ar-CH<sub>B+B'</sub>), 121.88 (quart. Ar-C), 81.31 (quart. OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 55.18 (+, COCHCH<sub>2</sub>), 48.01 (-, NCH<sub>2</sub>Ar), 36.36 (-, NCCH<sub>2</sub>N), 33.37 (-, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 28.21 (+, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.97 (-, NCCH<sub>2</sub>CH), 13.73 (+, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). MS (C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>, LC-MS, ESI)  $m/z$  (%): 411.2 [MH<sup>+</sup>] (100). Anal. (C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>) ber.: C 64,37; H 6,38; N 13,65; gef.: C 64,30; H 6,31; N 13,34.

**1-(4-(*tert*-Butoxymethyl)benzyl)-7-ethyl-1,4,8a,9-tetrahydro-6*H*-diimidazo[1,5-*a*:4',5'-*d*]pyridin-6,8(7*H*)-dion (79b)**

C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (M = 410,20 g/mol)



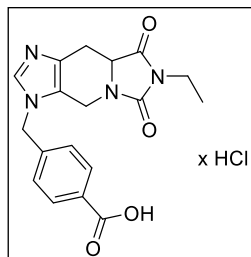
Die Synthese erfolgte gemäß der für **79a** beschriebenen Vorgehensweise ausgehend von 7-Ethyl-3,4,8a,9-tetrahydro-6*H*-diimidazo[1,5-*a*:4',5'-*d*]pyridin-6,8(7*H*)-dion hydrochlorid (**78**) (4,00 g, 18,16 mmol). Kristallisation (Ethylacetat) ergab einen Feststoff (0,42 g, 1,02 mmol, 6 %). Smp.: 85,0 - 85,5 °C. IR (KBr): 2978; 2935; 1710 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300

MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7.88 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, Ar-CH<sub>A/A'</sub>), 7.81 (s, 1H, NCHN), 7.27 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, Ar-CH<sub>B/B'</sub>), 5.37 – 5.20 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>-Ar(Benzyl)), 4.59 (d,  $J = 15.0$  Hz, 1H, OCNCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 4.32 (dd,  $J = 10.7, 5.6$  Hz, 1H, NCOCH), 4.11 (d,  $J = 15.2$  Hz, 1H, OCNCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 3.39 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.99 (dd,  $J = 14.9, 5.4$  Hz, 1H, OCCHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 2.41 (dd,  $J = 14.9, 10.9$  Hz, 1H, OCCHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 1.52 (s,  $J = 2.6$  Hz, 9H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.07 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  172.35 (quart. CO), 165.06 (quart. CO), 154.91 (quart. CO), 142.44 (quart. Ar-C), 138.36 (+, NCHN), 133.01 (quart. Ar-C), 131.13 (quart. Ar-C), 130.03 (+, Ar-CH<sub>A+A'</sub>), 127.94 (+, Ar-CH<sub>B+B'</sub>), 122.25 (quart. Ar-C), 81.25 (quart. OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 54.56 (+, COCHCH<sub>2</sub>), 47.62 (-, NCH<sub>2</sub>Ar), 39.15 (-, NCCH<sub>2</sub>N), 33.40 (-, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 28.22 (+, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 22.35 (-, NCCH<sub>2</sub>CH), 13.75 (+, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). MS (C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>, LC-MS, ESI)  $m/z$  (%): 411.2 [MH<sup>+</sup>] (100). Anal. (C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>) ber.: C 64,37; H 6,38; N 13,65; gef.: C 64,41; H 6,53; N 13,27.

**4-((7-Ethyl-6,8-dioxo-4,6,7,8,8a,9-hexahydro-3H-diimidazo[1,5-a:4',5'-d]pyridin-3-yl)methyl)benzoesäure hydrochlorid (80a)**

**C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (M = 390,11 g/mol)**

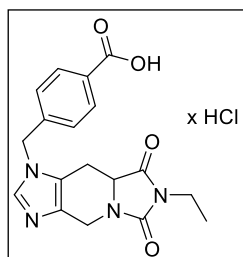


Die Freisetzung der Carbonsäure erfolgte ausgehend von *tert*-Butyl 4-((7-ethyl-6,8-dioxo-4,6,7,8,8a,9-hexahydro-3H-diimidazo[1,5-a:4',5'-d]pyridin-3-yl)methyl)benzoat (**79a**) (0,49 g, 2,10 mmol) in DCM (90 mL). Nach tropfenweiser Zugabe von 5 N HCl<sub>(iprop)</sub> (9 mL) wurde die Reaktionsmischung für 48 Std bei Raumtemperatur gerührt.

Zur Vervollständigung der Reaktion (DC-Kontrolle) wurde die Mischung für 1 Std auf 40 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Feststoff durch Kristallisation (Ethylacetat) gewonnen (0,31 g, 0,79 mmol; 38 %). Smp.: 241,5 - 242,0 °C. IR (KBr): 3460; 1700 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 13.15 (s, 1H, ArCOOH), 9.19 (s, 1H), 7.99 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.48 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 5.55 (d, *J* = 16.2 Hz, 2H), 4.80 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 4.38 (dd, *J* = 10.5, 5.5 Hz, 1H), 3.99 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 3.41 (dd, *J* = 14.3, 7.1 Hz, 2H), 3.15 (dd, *J* = 15.4, 5.3 Hz, 1H), 2.87 (dd, 1H), 1.08 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). HRMS (C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>, ESI-MS) *m/z* ber.: 377,1220 [MNa<sup>+</sup>], gef.: 377,1223 [MNa<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode B): 98,3 %, *t<sub>R</sub>* = 6,4 min.

**4-((7-Ethyl-6,8-dioxo-4,6,7,8,8a,9-hexahydro-1H-diimidazo[1,5-a:4',5'-d]pyridin-1-yl)methyl)benzoesäure hydrochlorid (80b)**

**C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (M = 390,11 g/mol)**

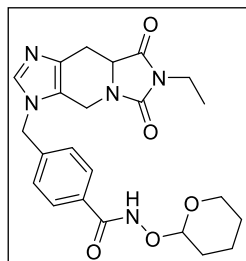


Die Darstellung erfolgte gemäß der für **80a** beschriebenen Vorgehensweise ausgehend von 1-(4-(*tert*-Butoxymethyl)benzyl)-7-ethyl-1,4,8a,9-tetrahydro-6H-diimidazo[1,5-a:4',5'-d]pyridin-6,8(7H)-dion (**79b**) (0,23 g, 0,56 mmol). Kristallisation (Ethylacetat) ergab einen Feststoff (0,17 g, 0,42 mmol; 75 %). Smp.: 200,5 - 201,0 °C. IR (KBr):

3433; 1709 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 13.12 (s, 1H), 9.20 (s, 1H), 7.96 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.43 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 5.56 (q, *J* = 15.7 Hz, 2H), 4.82 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 4.39 (dd, *J* = 10.5, 5.5 Hz, 1H), 4.27 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 3.40 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.22 (dd, *J* = 15.3, 5.3 Hz, 1H), 2.55 (dd, *J* = 12.2, 7.5 Hz, 1H), 1.08 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). HRMS (C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>, ESI-MS) *m/z* ber.: 355,1401 [MH<sup>+</sup>], gef.: 355,1406 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode B): 100 %, *t<sub>R</sub>* = 6,8 min.

**4-((7-Ethyl-6,8-dioxo-4,6,7,8,8a,9-hexahydro-3*H*-diimidazo[1,5-*a*:4',5'-*d*]pyridin-3-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (81a)**

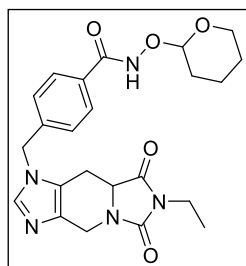
**C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> (M = 453,20 g/mol)**



Die Verbindung wurde in Anlehnung an **AV7** ausgehend von 4-((7-Ethyl-6,8-dioxo-4,6,7,8,8a,9-hexahydro-3*H*-diimidazo[1,5-*a*:4',5'-*d*]pyridin-3-yl)methyl)benzoesäure hydrochlorid (**80a**) (0,66 g, 1,69 mmol) synthetisiert. **80a** wurde in einer Mischung THF / DMF (1:1) gelöst und nach Zugabe von Benzotriazol-1-yloxy-tris (dimethylamino) phosphonium hexafluorophosphat (**24**) (0,92 g, 2,08 mmol), Diisopropylethylamin (0,66 mL, 5,10 mmol) und *O*-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)hydroxylamin (**25**) (0,66 g, 5,63 mmol) für 24 Std bei Raumtemperatur gerührt (DC-Kontrolle). Nach vollständiger Umsetzung wurde die Reaktionsmischung mit Ethylacetat extrahiert (4 x 50,0 mL) und die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. SC (DCM / MeOH (10:1)) ergab einen gelben Feststoff (0,80 g, 1,76 mmol; 96 %). Smp.: 130,5 - 131,0 °C. IR (KBr): 2943; 1709 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.66 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.76 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 5.28 (dd, 2H), 4.98 (s, 1H), 4.61 (d, 1H), 4.31 (dd, *J* = 10.9, 5.6 Hz, 1H), 3.95 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 3.39 (dd, *J* = 9.5, 4.7 Hz, 2H), 2.90 (dd, *J* = 15.0, 5.5 Hz, 1H), 2.61 (dd, 1H), 1.75 – 1.50 (m, 6H), 1.41 – 1.20 (m, 2H), 1.07 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). HRMS (C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>, ESI-MS) *m/z*: ber.: 454,2085 [MH<sup>+</sup>], gef.: 454,2090 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode B): 96,0 %, *t*<sub>R</sub> = 8,8 min.

**4-((7-Ethyl-6,8-dioxo-4,6,7,8,8a,9-hexahydro-1*H*-diimidazo[1,5-*a*:4',5'-*d*]pyridin-1-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (81b)**

**C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> (M = 453,20 g/mol)**

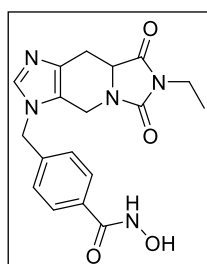


Die Darstellung der Verbindung wurde, nach der für **81a** beschriebenen Vorgehensweise, ausgehend von 4-((7-Ethyl-6,8-dioxo-4,6,7,8,8a,9-hexahydro-3*H*-diimidazo[1,5-*a*:4',5'-*d*]pyridin-3-yl)methyl)benzoesäure hydrochlorid (**80b**) (0,90 g, 2,30 mmol) synthetisiert. SC (DCM / MeOH (10:1)) ergab einen Feststoff (0,97 g, 2,14 mmol; 93 %). Smp.: 154,5 - 155,0 °C. IR (KBr): 2939; 1709 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.64 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 5.25 (dd, 2H), 4.96 (s, 1H), 4.58 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H), 4.32 (dd, *J* = 12.1, 6.0 Hz, 1H), 4.10 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 3.39

(q,  $J = 14.7, 7.5$  Hz, 2H), 3.01 (dd,  $J = 15.0, 5.5$  Hz, 1H), 2.44 (dd, 1H), 1.74 – 1.46 (m, 6H), 1.30 – 1.18 (m, 2H), 1.07 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H). HRMS ( $C_{23}H_{27}N_5O_5$ , ESI-MS)  $m/z$ : ber.: 454,2085 [ $MH^+$ ], gef.: 454,2091 [ $MH^+$ ]. RP-HPLC (220 nm, Methode B): 95,0 %,  $t_R = 6,3$  min.

**4-((7-Ethyl-6,8-dioxo-4,6,7,8,8a,9-hexahydro-3H-diimidazo[1,5-*a*:4',5'-*d*]pyridin-3-yl)methyl)-*N*-hydroxybenzamid (74a)**

**$C_{18}H_{19}N_5O_4$  (M = 369,14 g/mol)**



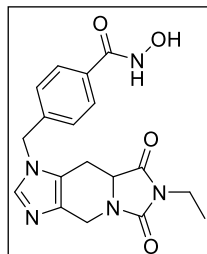
Die Entschützung erfolgte in Anlehnung an **AV8** ausgehend von 4-((7-Ethyl-6,8-dioxo-4,6,7,8,8a,9-hexahydro-3H-diimidazo[1,5-*a*:4',5'-*d*]pyridin-3-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)benzamid (**81a**) (0,80 g, 1,76 mmol), welches bei 65 °C in Methanol (30,0 mL) gelöst wurde. Nach tropfenweiser Zugabe von 5 N HCl<sub>(iprop)</sub> (3,00 mL) wurde die

Reaktionsmischung bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Umsetzung (DC-Kontrolle) gerührt. Kristallisation aus Isopropanol durch Einengen des Lösungsmittels auf die Hälfte ergab einen beigen Feststoff (0,30 g, 0,81 mmol; 46 %). Smp.: 210,0 - 211,0 °C. IR (KBr): 1707; 1643; 1463  $cm^{-1}$ .  $^1H$ -NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  11.32 (s, 1H, NHOH), 9.18 (s, 1H, NCHN), 7.81 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, Ar-H<sub>A+A'</sub>), 7.45 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, Ar-H<sub>B+B'</sub>), 5.54 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar (Benzyl)), 4.81 (d,  $J = 15.7$  Hz, 1H, OCNCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 4.38 (dd,  $J = 10.5, 5.5$  Hz, 1H, NCOCH), 4.01 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H, OCNCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 3.41 (q,  $J = 7.0$  Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.14 (dd,  $J = 15.4, 5.4$  Hz, 1H, COCHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 2.92 - 2,78 (m, 1H, COCHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 1.08 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

$^{13}C$ -NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  171.69 (quart. CO), 163.22 (quart. CO), 154.86 (quart. CO), 137.43 (quart. Ar-C), 136.13 (+, NCHN), 133.48 (quart. Ar-C), 128.54 (+, Ar-CH<sub>A+A'</sub>), 128.09 (+, Ar-CH<sub>B+B'</sub>), 126.54 (quart. Ar-C), 124.85 (quart. Ar-C), 53.72 (+, COCHCH<sub>2</sub>), 49.90 (-, NCH<sub>2</sub>-Ar (Benzyl)), 35.66 (-, NCCH<sub>2</sub>N), 33.59 (-, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 22.75 (-, NCCH<sub>2</sub>CH), 13.67 (+, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). HRMS ( $C_{18}H_{19}N_5O_4$ , ESI-MS)  $m/z$ : ber.: 370,1510 [ $MH^+$ ], gef.: 370,1517 [ $MH^+$ ]. RP-HPLC (220 nm, Methode B): 95,1 %,  $t_R = 4,5$  min.

**4-((7-Ethyl-6,8-dioxo-4,6,7,8,8a,9-hexahydro-1*H*-diimidazo[1,5-*a*:4',5'-*d*]pyridin-1-yl)methyl)-*N*-hydroxybenzamid (**74b**)**

**C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> (M = 369,14 g/mol)**



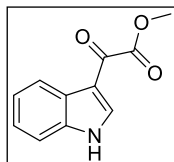
Die Entschützung erfolgte, laut der für **74a** beschriebenen Vorgehensweise, ausgehend von 4-((7-Ethyl-6,8-dioxo-4,6,7,8,8a,9-hexahydro-1*H*-diimidazo[1,5-*a*:4',5'-*d*]pyridin-1-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (**81b**) (0,97 g, 2,14 mmol). Kristallisation (Isopropanol) und Einengen des Lösungsmittels auf die Hälfte ergaben einen Feststoff (0,40 g, 1,08 mmol; 51 %). Smp.: 200,0 - 200,5 °C. IR (KBr): 1707; 1641; 1463 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.30 (s, 1H, NHOH), 9.19 (s, 1H, NCHN), 7.78 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar-H<sub>A+A'</sub>), 7.40 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar-H<sub>B+B'</sub>), 5.52 (dd, *J* = 23.7, 11.9 Hz, NCH<sub>2</sub>Ar (Benzyl)), 4.81 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, OCNCH<sub>AH<sub>B</sub></sub>), 4.39 (dd, *J* = 10.5, 5.5 Hz, 1H, NCOCH), 4.01 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, OCNCH<sub>AH<sub>B</sub></sub>), 3.40 (q, *J* = 14.2, 7.1 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.24 (dd, *J* = 15.3, 5.4 Hz, 1H, COCHCH<sub>AH<sub>B</sub></sub>), 2.55 (dd, *J* = 15.3, 5.4 Hz, 1H, COCHCH<sub>AH<sub>B</sub></sub>), 1.08 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 171.63 (quart. CO), 161.92 (quart. CO), 154.83 (quart. CO), 137.84 (quart. Ar-C), 136.18 (+, NCHN), 133.26 (quart. Ar-C), 128.26 (+, Ar-CH<sub>A+A'</sub>), 125.92 (+, Ar-CH<sub>B+B'</sub>), 62.47 (quart. Ar-C), 53.78 (+, COCHCH<sub>2</sub>), 49.38 (-, NCH<sub>2</sub>-Ar (Benzyl)), 36.41 (-, NCCH<sub>2</sub>N), 33.61 (-, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 25.95 (quart. Ar-C), 21.78 (-, NCCH<sub>2</sub>CH), 13.67 (+, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). HRMS (C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>, ESI-MS) *m/z*: ber.: 370,1510 [MH<sup>+</sup>], gef.: 370,1516 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode B): 96,9 %, *t<sub>R</sub>* = 4,5 min.

## 9.4.8 Verbindungen für die biotechnologische Vorgehensweise

### Methyl 2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetat (**84**)

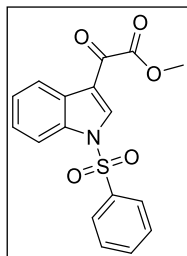
$\text{C}_{11}\text{H}_9\text{NO}_3$  ( $M = 203,06 \text{ g/mol}$ )



Synthese modifiziert nach Lit.<sup>309</sup> ausgehend von Indol (**14a**) (2,93 g, 25,00 mmol), welches in THF (100 mL) gelöst wurde. Nach Zugabe von Oxalylchlorid (2,57 mL) wird das Reaktionsgemisch für 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von MeOH (3,00 mL) und die Mischung wurde für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde gestoppt (DC-Kontrolle) und extrahiert (Ethylacetat; 3 x 100 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das LM entfernt. Beim Einengen des Volumens präzipitierte das Produkt (3,61 g). Das Einengen der Mutterlauge lieferte weitere 0,77 g Produkt. Gesamtausbeute (4,38 g, 21,6 mmol; 86 %, beiger Feststoff). Smp.: 227,7 - 228,8 °C. Lit.<sup>310</sup>: 228,0 °C.

### Methyl 2-oxo-2-(1-(phenylsulfonyl)-1*H*-indol-3-yl)acetat (**85**)

$\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{NO}_5\text{S}$  ( $M = 343,05 \text{ g/mol}$ )

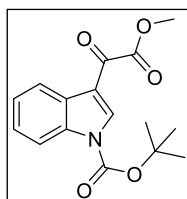


Die Synthese erfolgte ausgehend von Methyl 2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetat (**84**) (0,40 g, 1,97 mmol) in DMF (10 mL). Nach Zugabe von NaH (0,10 g) wurde das Reaktionsgemisch für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde eine Lösung (0,32 mL) aus Phenylsulfonylchlorid (0,44 g) in DMF (5 mL) zum Ansatz hinzugegeben und der Reaktionsfortschritt mittels DC-Kontrolle (Ethylacetat / Petrolether (1:2)) überwacht. Extraktion (Ethylacetat; 3 x 50 mL) und SC (Ethylacetat / Petrolether (1:4)) ergaben einen Feststoff (0,54 g, 1,61 mmol; 82 %). Smp.: 136,3 - 137,0 °C. Lit.<sup>311</sup>: 124,0 - 125,0 °C.



***tert*-Butyl 3-(2-methoxy-2-oxoacetyl)-1*H*-indol-1-carboxylat (86)**

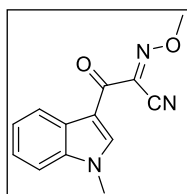
**C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub> (M = 303,11 g/mol)**



Die Synthese erfolgte nach Lit.<sup>312</sup> ausgehend von Methyl 2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetat (**84**) (0,40 g, 1,97 mmol) in DMF (10 mL). Nach Zugabe von Boc-Anhydrid (0,48 mmol) und DMAP (0,15 mmol) wurde das Reaktionsgemisch für 3 Std bei Raumtemperatur gerührt. Extraktion (Ethylacetat; 3 x 50 mL) und SC (Ethylacetat / Petrolether (1:4)) ergaben einen Feststoff (0,52 g, 1,71 mmol; 87 %). Smp.: 130,3 °C. Lit.<sup>313</sup>: 129,0 - 130,0 °C.

**(*E*)-*N*-Methoxy-2-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetimidoyl cyanid (87)**

**C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (M = 241,09 g/mol)**

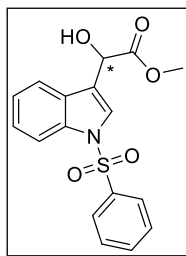


Die Darstellung erfolgte ausgehend vom käuflich erworbenen (*E*)-*N*-Hydroxy-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetimidoyl cyanid (0,61 g, 2,85 mmol), welches in 2-Butanon (10 mL) gelöst wurde. Der Reaktionsansatz wurde dann auf 0 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur erfolgte die Zugabe von Dimethylsulfat (0,82 mL), sowie die portionsweise Zugabe von K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,19 g). Daraufhin wurde das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur für 16 Std gerührt und der Reaktionsfortschritt mittels DC-Kontrolle (Ethylacetat / Petrolether (1:2)) überwacht. Extraktion (Ethylacetat; 3 x 50 mL) und SC (Ethylacetat / Petrolether (1:2)) ergaben einen orange farbenen Feststoff (0,40 g, 1,66 mmol; 58 %). Smp.: 114,4 - 114,9 °C. IR (KBr): 2362; 2338; 1620 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.54 (s, 1H, Ar-H), 8.25 – 8.17 (m, 1H, Ar-H), 7.67 – 7.59 (m, 1H, Ar-H), 7.41 – 7.30 (m, 2H, Ar-H), 4.36 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.94 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 175.79 (quart. CO), 141.57 (+, Ar-CH), 137.56 (quart. Ar-C), 132.69 (quart. Ar-C), 126.97 (quart. Ar-C), 124.22 (+, Ar-CH), 123.70 (+, Ar-CH), 121.80 (+, Ar-CH), 111.66 (+, Ar-CH), 111.37 (quart. Ar-C), 66.12 (+, OCH<sub>3</sub>), 34.12 (+, NCH<sub>3</sub>). HRMS (C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, ESI-MS) *m/z*: ber.: 242,0924 [MH<sup>+</sup>], gef.: 242,0929 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 95,0 %, t<sub>R</sub> = 18,9 min.

**(+)-Methyl 2-hydroxy-2-(1-(phenylsulfonyl)-1*H*-indol-3-yl)acetat ((+)-82a)**

**C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>5</sub>S (M = 345,07 g/mol)**



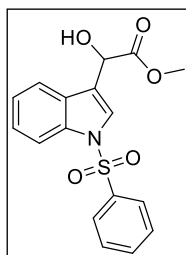
Die biotechnologische Synthese erfolgte modifiziert nach Lit.<sup>314</sup> ausgehend von Methyl 2-oxo-2-(1-(phenylsulfonyl)-1*H*-indol-3-yl)acetat (**85**) (0,78 g, 2,27 mmol). Die Reaktion wurde für 3,5 Wochen bei Raumtemperatur gerührt und mittels DC (Petrolether / Ethylacetat (2:1)) kontrolliert. Extraktion (Ethylacetat, 3 x 50 mL) und SC(Petrolether / Ethylacetat (2:1)) ergaben einen Feststoff (0,03 g, 0,15 mmol; 7 %). Smp.: 273,6 °C. IR (KBr): 3439; 1750; 1103 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.02 – 7.96 (m, 2H, Ar-H), 7.93 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.82 (s, 1H, Ar-H), 7.75 – 7.57 (m, 4H, Ar-H), 7.40 – 7.23 (m, 2H, Ar-H), 6.18 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, CHOH), 5.43 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, CHOH), 3.61 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 172.83 (quart. CO), 137.46 (quart. Ar-C), 135.24 (+, Ar-CH), 134.91 (quart. Ar-C), 130.40 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 128.90 (quart. Ar-C), 127.17 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 125.51 (+, Ar-CH), 125.13 (+, Ar-CH), 123.90 (+, Ar-CH), 121.89 (quart. Ar-C), 121.52 (+, Ar-CH), 113.60 (+, Ar-CH), 66.53 (+, CHOH), 52.44 (+, OCH<sub>3</sub>). Die Zuordnung der Protonen erfolgte in Analogie zum entsprechenden Racemat **82a**.

**HPLC** (Chiracel OD-H, Hexan 85 %: 15 % <sup>i</sup>Prop., 0,6 mL / min, 15 µL, 220 nm): *t<sub>R</sub>* = 34,4 min (+)-Enantiomer ≥ 99 % ee. [ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>20</sup> + 24,8 (c 0,1; Ethylacetat). MS (C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>5</sub>S, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 328 [MH<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O] (100), 363 [MNH<sub>4</sub><sup>+</sup>] (41), 368 [MNa<sup>+</sup>] (21), 713 [2MNa<sup>+</sup>] (32). Anal. (C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>5</sub>S) ber.: C 59, 12; H 4,38; N 4,06; gef.: C 59, 54; H 4,48; N 4,03.

**Methyl 2-hydroxy-2-(1-(phenylsulfonyl)-1*H*-indol-3-yl)acetat (82a)**

**C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>5</sub>S (M = 345,07 g/mol)**



Die Synthese erfolgte in Anlehnung an Lit.<sup>315</sup> ausgehend von Methyl 2-oxo-2-(1-(phenylsulfonyl)-1*H*-indol-3-yl)acetat, (**85**) (1,00 g, 2,91 mmol), indem eine Lösung in MeOH bei 0 °C hergestellt wurde. Zu dieser wurde NaBH<sub>4</sub> (0,5 eq) portionsweise gegeben und der Reaktionsverlauf mittels DC-Kontrolle überwacht (DCM / MeOH (10:1)). Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf H<sub>2</sub>O gegossen. Extraktion (DCM) ergab einen Feststoff (0,78 g, 2,26 mmol; 78 %). Smp.: 119,4 °C. IR (KBr): 3412; 3345; 1750; 1178 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR

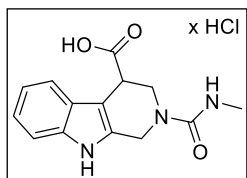
(300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  8.03 – 7.96 (m, 2H, Ar-H), 7.93 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.82 (s, 1H, Ar-H), 7.76 – 7.56 (m, 4H, Ar-H), 7.41 – 7.23 (m, 2H, Ar-H), 6.17 (d,  $J$  = 4.9 Hz, 1H, CHOH), 5.43 (d,  $J$  = 4.7 Hz, 1H, CHOH), 3.61 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  172.83 (quart. CO), 137.46 (quart. Ar-C), 135.24 (+, Ar-CH), 134.91 (quart. Ar-C), 130.40 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 128.90 (quart. Ar-C), 127.17 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 125.51 (+, Ar-CH), 125.13 (+, Ar-CH), 123.90 (+, Ar-CH), 121.89 (quart. Ar-C), 121.52 (+, Ar-CH), 113.60 (+, Ar-CH), 66.53 (+, CHOH), 52.44 (+, OCH<sub>3</sub>) MS ( $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_5\text{S}$ , LC-MS, ESI)  $m/z$  (%): 328 [ $\text{MH}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ] (100), 363 [ $\text{MNH}_4^+$ ] (22), 368 [ $\text{MNa}^+$ ] (25), 713 [ $2\text{MNa}^+$ ] (43). Anal. ( $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_5\text{S}$ ) ber.: C 59, 12; H 4,38; N 4,06; gef.: C 59, 45; H 4,38; N 3,98.

#### 9.4.9 Ausgangsverbindung für die angestrebte Diastomerentrennung

##### 2-(Methylcarbamoyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-4-carbonsäure hydrochlorid (**91**)

$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{O}_3$  (M = 309,09 g/mol)



Methyl 2-(methylcarbamoyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-4-carboxylat (**19a**) (1,5 g, 5,22 mmol) wurde in einer Mischung aus THF / H<sub>2</sub>O (8:2) gelöst. Nach Zugabe von LiOH (1,2 eq) wurde das Reaktionsgemisch auf 40 °C erhitzt (DC-Kontrolle). Mit stark verdünnter HCl-Lösung (0,2 N) präzipitierte der schwach gelbe Feststoff (0,6 g, 2,20 mmol; 42 %). Smp.: 229,4 - 229,9 °C. IR (KBr): 3386; 3345; 1720; 1567 cm<sup>-1</sup>.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  12.46 (s, 1H, COOH), 11.00 (s, 1H, NH (Indol)), 7.41 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.31 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.08 – 6.92 (m, 2H, Ar-H), 6.63 (q,  $J$  = 3.9 Hz, 1H, -NHCH<sub>3</sub>), 4.53 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>C), 3.94-3.86 (m, 1H, NCH<sub>2</sub>CH), 3.83 – 3.70 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH), 2.60 (d,  $J$  = 4.2 Hz, 3H, NHCH<sub>3</sub>).

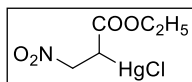
$^{13}\text{C}$ -HMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  174.48 (quart. CO), 158.31 (quart. CO), 136.41 (quart. Ar-C), 133.28 (quart. Ar-C), 126.70 (quart. Ar-C), 121.21 (+, Ar-CH), 119.08 (+, Ar-CH), 118.66 (+, Ar-CH), 111.50 (+, Ar-CH), 105.82 (quart. Ar-C), 44.64 (-, NCH<sub>2</sub>CH), 41.97 (-, NCH<sub>2</sub>C), 39.27 (+, NCH<sub>2</sub>CH), 27.73 (+, NHCH<sub>3</sub>). MS ( $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$ , LC-MS, ESI)  $m/z$  (%): 274 [ $\text{MH}^+$ ] (100), 569 [ $2\text{MNa}^+$ ] (11). Anal. ( $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{O}_3$ ) ber.: C 61,53; H 5,53; N 15,38; gef.: C 61,27; H 5,58; N 15,24.

## 9.4.10 Enantiomere der Inhibitoren mit Kopfgruppe 1

### 9.4.10.1 R- und S- Marbostat-100 (R-13a und S-13a)

#### (1-Ethoxy-3-nitro-1-oxopropan-2-yl) quecksilber (II) chlorid (99)

$\text{C}_5\text{H}_8\text{ClHgNO}_4$  (M= 382,98 g/mol)

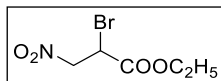


Synthese analog Lit..<sup>137</sup>  $\text{NaNO}_2$  (6,24 g, 90,0 mmol) wurde in  $\text{H}_2\text{O}$  (100 mL) gelöst. Nach Zugabe von  $\text{HgCl}_2$  (12,5 g, 46,0 mmol) wurde Ethylacrylat (5,24 g, 48,0 mmol) zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt, mit  $\text{H}_2\text{O}$  und Petrolether gewaschen und *in vacuo* getrocknet. Man erhielt einen Feststoff (15,9 g, 41,7 mmol; 91 %). Smp.: 141,2 - 141,6 °C. IR (KBr): 2986; 1699; 1543  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  4.99 – 4.71 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{NO}_2$ ), 4.11 – 3.95 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.41 (dd,  $J = 11.9, 3.8$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2$ ), 1.16 (t, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  172.94 (quart.  $\text{CO}$ ), 74.51 (+,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 60.38 (+,  $\text{CH}_2\text{NO}_2$ ), 41.15 (-,  $\text{CHCH}_2$ ), 14.59 (-,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ). Bei der Aufnahme des Dept 135-Spektrums erschienen bei dieser Verbindung, die  $\text{CH}_2$ -Gruppen im „positivem“ Bereich und die  $\text{CH}$ - bzw.  $\text{CH}_3$ -Gruppen im „negativem“. Anal. ( $\text{C}_5\text{H}_8\text{ClHgNO}_4$ ) ber.: C 15,71; H 2,11; N 3,67; gef.: C 15,68; H 2,19; N 3,57.

#### Ethyl 2-bromo-3-nitropropanoat (100)

$\text{C}_5\text{H}_8\text{BrNO}_4$  (M = 224,93 g/mol)

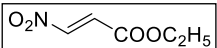


Synthese analog Lit..<sup>137</sup> **99** (15,93 g, 41,7 mmol) wurde in  $\text{H}_2\text{O}$  (45 mL) und Diethylether (135 mL) suspendiert. Der Ansatz wurde dann im Eisbad auf 0 °C gekühlt und unter starkem Rühren wurde Brom (3,85 mL, 74,8 mmol) langsam über einen Tropftrichter zugetropft. Man ließ die Mischung auf Raumtemperatur erwärmen und über Nacht rühren. Die Reaktionsmischung wurde neutralisiert ( $\text{NaHCO}_3$ ; 5 % in  $\text{H}_2\text{O}$ ), die organischen Phasen abgetrennt, die Wasserphase mit Diethylether ausgeschüttelt und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. SC (Petrolether / Diethylether (2:1)) ergab ein gelbes Öl (6,71 g, 29,7 mmol; 71 %). IR (ATR): 2986; 1737; 1559  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.13 – 5.01 (m, 1H,  $\text{CHBr}$ ), 4.81 – 4.69 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{NO}_2$ ), 4.37 – 4.24 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.32 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  166.99 (quart.  $\text{C=O}$ ), 75.17 (-,  $\text{CH}_2\text{NO}_2$ ), 63.17 (-,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 35.28 (+,  $\text{CHCH}_2$ ), 13.92 (+,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ). HRMS ( $\text{C}_5\text{H}_8\text{BrNO}_4$ , ESI-MS)  $m/z$ : ber.: 242,9975 [ $\text{MNH}_4^+$ ], gef.: 242,9980 [ $\text{MNH}_4^+$ ]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 99,2 %,  $t_R$  = 1,2 min.

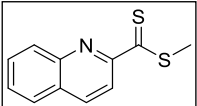
### Ethyl (*E*)-3-nitroacrylat (101)

$\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_4$  (M = 145,04 g/mol)

 Synthese analog Lit..<sup>137</sup> **100** (1,0 g, 4,42 mmol) wurde unter Argonatmosphäre in Diethylether (13 mL) gelöst. Nach Zugabe von trockenem Natriumacetat (0,55 g, 6,7 mmol) wurde das Reaktionsgemisch für 3 Std refluxiert. Nach dem Abkühlen, wurde der Ansatz mit Diethylether (13 mL) verdünnt, die organischen Phasen mit Natriumthiosulfat-Lösung gewaschen, über  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$  getrocknet und einrotiert. Der Rückstand wurde kurz an der HV-Pumpe getrocknet und die vollständige Umsetzung der Reaktion mittels NMR überprüft. Bei nicht vollständiger Umsetzung wurde der Ansatz nochmals mit Natriumacetat (0,30 g) umgesetzt. Man erhielt ein gelbes Öl (0,40 g, 2,76 mmol; 62 %).  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.67 (d,  $J$  = 13.5 Hz, 1H), 7.08 (d,  $J$  = 13.5 Hz, 1H), 4.30 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 1.34 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H). Lit..<sup>316</sup>:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.68 (d,  $J$  = 13.5 Hz, 1 H), 7.08 (d,  $J$  = 13.5 Hz, 1 H), 4.32 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2 H), 1.35 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3 H).

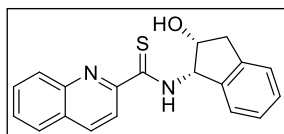
### Methyl quinolin-2-carbodithioat (94)

$\text{C}_{11}\text{H}_9\text{NS}_2$  (M = 219,02 g/mol)

 Synthese analog Lit..<sup>136</sup> Schwefel (3,53 g, 0,11 mol) und Triethylamin (0,15 mol) wurden in DMSO (25 mL) gelöst. Unter starkem Rühren wurde 2-Chlormethylchinolinhydrochlorid (10,70 mmol) portionsweise hinzugegeben. Nach 3 Std wurde unter Kühlung ( $T < 15^\circ\text{C}$ ) Iodmethan (3,44 mL, 0,055 mol) langsam dazugetropft. Der Ansatz wurde im Anschluss mit Eiswasser versetzt (200 mL), woraufhin ein Feststoff präzipitierte. Der Niederschlag wurde mit 50 % Ethanol-Lösung gewaschen und getrocknet. Man erhielt einen roten Feststoff (7,0 g, 0,03 mol; 29 %). Smp.: 129,0 - 131,0  $^\circ\text{C}$ . Lit..<sup>136</sup>: 130,0 - 132,0  $^\circ\text{C}$  (EtOH).

***N*-((1*S*,2*R*)-2-Hydroxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-yl)quinolin-2-carbothioamid**

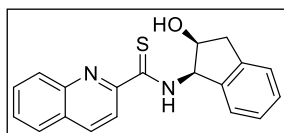
**C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>OS (M = 320,10 g/mol) 96b**



Darstellung analog Lit.<sup>135</sup> **94** (1,87 g, 8,53 mmol) und Aminoindanol [**1S**, **2R**] (**95b**) (1,27 g, 8,53 mmol) wurden in DCM (35 mL) gelöst und für 16 Std bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss daran wurden 15 g Kieselgel zugegeben und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Zweimalige SC (1. DCM / Petrolether (2:1), 2. DCM pur) („dryload“-Methode) ergab einen orange-roten Feststoff (1,4 g, 4,37 mmol; 51 %). Smp.: 172,0 °C. Lit.<sup>135</sup>: 171,0 - 172,0 °C.

***N*-((1*R*,2*S*)-2-Hydroxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-yl)quinolin-2-carbothioamid (96a)**

**C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>OS (M = 320,10 g/mol)**

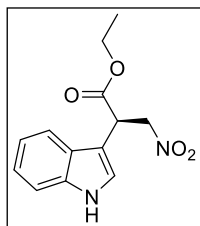


Darstellung analog Lit.<sup>135</sup> Die Vorgehensweise ist wie für **96b** beschrieben, nur wird hier das Aminoindanol (**95a**) [**1R**, **2S**] verwendet. SC (1. DCM / Petrolether (2:1); 2. DCM pur) ergab einen gelben Feststoff (2,0 g, 6,24 mmol; 73 %). Smp.: 168,7 - 168,9 °C. IR (KBr): 3415; 3254; 1501 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 10.86 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, NH), 8.90 – 8.85 (m, 1H, Ar-H), 8.31 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar-H), 8.08 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.87 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.77 – 7.70 (m, 1H, Ar-H), 7.64 – 7.59 (m, 1H, Ar-H), 7.43 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.37 – 7.24 (m, 3H, Ar-H), 6.74 – 6.22 (m, 1H, CHOH), 5.06 – 5.00 (m, 1H, CHNH), 3.35 (dd, *J* = 16.7, 5.3 Hz, 1H, CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.12 (dd, *J* = 16.7, 1.7 Hz, 1H, CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 192.21 (quart. CS), 150.12 (quart. Ar-C), 145.26 (quart. Ar-C), 140.48 (quart. Ar-C), 139.57 (quart. Ar-C), 137.24 (+, Ar-CH), 130.48 (+, Ar-CH), 129.85 (+, Ar-CH), 129.23 (quart. Ar-C), 128.68 (+, Ar-CH), 128.23 (+, Ar-CH), 127.64 (+, Ar-CH), 127.34 (+, Ar-CH), 125.59 (+, Ar-CH), 124.89 (+, Ar-CH), 121.69 (+, Ar-CH), 73.64 (+, CHNH), 63.51 (+, CHOH), 40.12 (-, CH<sub>2</sub>CH). [α]<sub>D</sub><sup>20</sup><sub>589</sub> – 73,1 (c 0,1; MeOH). MS (C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>OS, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 321 [MH<sup>+</sup>] (100), 287 [MH<sup>+</sup> – SH<sub>2</sub>] (21). Anal. (C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>OS) ber.: C 71,22; H 5,03; N 8,74; gef.: C 70,89; H 5,24; N 8,43.

**(R)-Ethyl 2-(1*H*-indol-3-yl)-3-nitropropanoat (*R*-102)**

**C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M = 262,10 g/mol)**

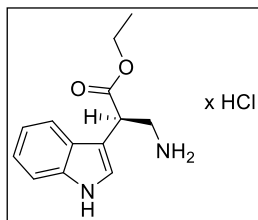


Die Synthese erfolgte ausgehend von *N*-((1*R*,2*S*)-2-Hydroxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-yl)quinolin-2-carbothioamid (**96a**) (1,375 g; 4,29 mmol), welches seinerseits aus Methyl quinolin-2-carbodithioat (**94**) und (1*R*,2*S*)-1-Amino-2,3-dihydro-1*H*-inden-2-ol (**95a**) hergestellt wurde, nach der Vorgehensweise, wie es in der Lit.<sup>135</sup> für das Enantiomer *S*-**102** (1*S*, 2*R*) beschrieben wird. **96a** wurde unter Schutzgasatmosphäre in CHCl<sub>3</sub> p.a. gelöst (80,0 mL) und unter Rühren wurde CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H (382,5 µL) bei Raumtemperatur langsam hinzuge tropft. Die Lösung wurde für weitere 5 min bei Raumtemperatur gerührt, bevor die Zugabe von Natrium tetrakis[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]borat (4,0 g, 4,24 mmol) in Einem erfolgte. Zur *in situ*-Bildung des aktiven Thioharnstoff-Katalysators **97a** wurde die Mischung für weitere 10 min bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluss darauf auf -60 °C gekühlt. Zu diesem Reaktionsgemisch wurde über einen Tropftrichter eine Lösung bestehend aus (*E*)-ethyl 3-nitroacrylat (**101**) (2,5 g, 17,23 mmol) in CHCl<sub>3</sub> (5,0 mL) hinzuge tropft, sowie im Anschluss daran eine Lösung bestehend aus Indol (**14a**) (3,0 g, 25,17 mmol) in CHCl<sub>3</sub>, die ihrerseits ebenfalls langsam zugetropft wurde. Nach Zugabe aller genannten Bestandteile, wurde der Reaktionsansatz für 16 Std bei -60 °C gerührt. Zum Quenchen der Reaktion wurde eine NaCl<sub>(aq)</sub>-Lösung (5,0 mL) hinzugegeben. Nach dem der Reaktionsansatz Raumtemperatur angenommen hatte, wurden die organischen Phasen mit HCl (2 M) gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das LM unter reduziertem Druck entfernt. SC (DCM / n-Hexan / Ethylacetat (1:5:1)) ergab ein gelbes Öl (2,00 g, 7,63 mmol; 30 %). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.24 (s, 1H), 7.67 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.28 – 7.15 (m, 3H), 5.21 (dd, *J* = 14.2, 9.7 Hz, 1H), 4.74 (dd, *J* = 9.7, 4.9 Hz, 1H), 4.64 (dd, *J* = 14.2, 4.9 Hz, 1H), 4.32 – 4.07 (m, 2H), 1.23 (t, *J* = 8.5, 5.8 Hz, 3H). Lit.<sup>317</sup>: <sup>1</sup>H-NMR (CHCl<sub>3</sub>): δ 4.72 (m, 1H), 4.62 (m, 1H), 5.19 (dd, 1H, *J* = 14.5, *J* = 10.0), 1.23 (t, 3H, *J* = 7.00), 4.25 (m, 2H), 7.00-7.70 (m, 5H), 8.55 (s, 1H). Da in der Literatur das Racemat beschrieben ist, sind ferner der ee-Wert, sowie der Drehwert angegeben.

**HPLC** (Chiracel OD-H, Hexan 85 %: 15 % <sup>i</sup>Prop., 0,6 mL / min, 1 µL, 220 nm): *t<sub>R</sub>* = 105,7 min *R*-Enantiomer, *t<sub>R</sub>* = 90,8 min *S*-Enantiomer; ≥ 99 % ee, [ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>20</sup> + 134,1 (c 0,1; MeOH).

**(R)-Ethyl 3-amino-2-(1*H*-indol-3-yl)propanoat hydrochlorid (*R*-103)**

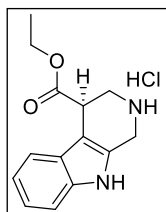
**C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M = 268,10 g/mol)**



Die Darstellung erfolgte ausgehend von (*R*)-Ethyl 2-(1*H*-indol-3-yl)-3-nitropropanoat (**R-102**) (3,57g, 13,61 mmol) nach **AV1**. SC (DCM / MeOH (5:1)+1 % NH<sub>3</sub>) und ansäuern (5-6 N HCl<sub>(iprop)</sub>) ergab einen Schaum (2,8 g, 10,68 mmol; 79 %). IR (KBr): 3310; 3021; 2975; 1730 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.25 (s, 1H), 8.12 (s, 2H), 7.58 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.17 – 6.97 (m, 2H), 4.30 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.10 (q, *J* = 10.8, 7.1 Hz, 2H), 3.47 (dd, *J* = 12.7, 8.1 Hz, 1H), 3.15 (dd, *J* = 12.7, 6.6 Hz, 1H), 1.12 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). [α]<sub>589</sub><sup>20</sup> +86,9 (c 0.1; MeOH). HRMS (C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ESI-MS) *m/z*: ber.: 233,1285 [MH<sup>+</sup>], gef.: 233,1289 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode B): 95,6 %, *t<sub>R</sub>* = 6,9 min.

**(R)-Ethyl 2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat hydrochlorid (*R*-104)**

**C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M = 280,10 g/mol)**



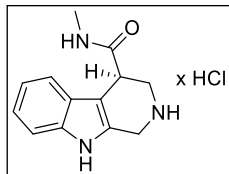
Die Synthese erfolgte ausgehend von (*R*)-Ethyl 3-amino-2-(1*H*-indol-3-yl)propanoat hydrochlorid (**R-103**) (2,8 g, 10,68 mmol), nach **AV2**, wobei der Reaktionsansatz nicht auf 60 °C erhitzt wurde, sondern für 24 Std bei Raumtemperatur gerührt wurde. Kristallisation (Diethylether) ergab einen Feststoff (2,0 g, 7,12 mmol; 67 %). Smp.: 269,1 - 271,8 °C. IR (KBr): 3201; 1730 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.40 (s, 1H), 7.55 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.17 – 6.98 (m, 2H), 4.41 – 4.28 (m, 2H), 4.24 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H), 4.22 – 4.07 (m, 2H), 3.68 (dd, *J* = 12.8, 4.8 Hz, 1H), 3.52 (dd, *J* = 12.8, 5.3 Hz, 1H), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

**HPLC** (Chiracel OD-H, Hexan 85 %: 15 % <sup>i</sup>Prop., 0,6 mL / min, 1 μL, 220 nm): *t<sub>R</sub>* = 20,7 min *R*-Enantiomer, *t<sub>R</sub>* = 19,3 min *S*-Enantiomer; ≥ 99 % ee, [α]<sub>589</sub><sup>20</sup> + 97,2 (c 0,1; MeOH). MS (C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 245 [MH<sup>+</sup>] (100). Anal. (C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ber.: C 59,89; H 6,10; N 9,98; gef.: C 59,97; H 6,28; N 9,95.



**(R)-N-Methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-4-carboxamid hydrochlorid  
(R-105)**

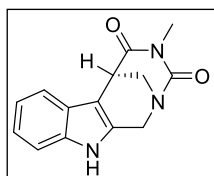
**C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>3</sub>O (M = 265,10 g/mol)**



Die Darstellung erfolgte gemäß der Lit.<sup>138,318</sup> die Cyanid als einen effizienten und milden Katalysator für die Aminolyse von Estern beschreibt. Dafür wird (R)-Ethyl 2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-4-carboxylat hydrochlorid (**R-104**) (0,5 g; 3,56 mmol) in einer methanolischen Methylamin-Lösung (30 %, 0,6 mL) bei 0 °C gelöst und eine katalytische Menge an NaCN (0,095 g) hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wird bei 0 °C für 5 Tage gerührt und der Reaktionsverlauf mittels DC-Kontrolle (DCM / MeOH 5:1 + 1 % NH<sub>3conc.</sub>) überwacht. Nach 5 Tagen wird das LM im Ölpumpenvakuum schonend abgezogen und der Rückstand auf Kieselgel aufgezogen. SC (SiO<sub>2</sub>; DCM / MeOH / NH<sub>3conc.</sub> 5:1:1 %) („dryload“-Methode) ergab einen Feststoff (1,39 g, 6,07 mmol; 77 %). Smp.: 265,6 - 267,0 °C. IR (KBr): 2925; 1653 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.81 (s, 1H), 7.99 – 7.91 (m, 1H), 7.31 (dd, *J* = 24.2, 7.8 Hz, 2H), 7.04 – 6.87 (m, 2H), 3.95 – 3.77 (m, 2H), 3.51 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H), 3.11 (dd, *J* = 12.9, 4.5 Hz, 1H), 2.99 (dd, *J* = 12.9, 4.9 Hz, 1H), 2.60 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H). [ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>20</sup> + 25,0 (c 0,1; MeOH). HRMS (C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O, ESI-MS) *m/z*: ber.: 230,1288 [MH<sup>+</sup>], gef.: 230,1286 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode B): 98,7 %, *t*<sub>R</sub> = 5,7 min.

**(6R)-4-Methyl-6,11-dihydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-b]indol-3,5(1H,4H)-dion  
(R-20a)**

**C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (M = 255,10 g/mol)**



Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die Lit.<sup>140</sup> ausgehend von (R)-N-Methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-4-carboxamid hydrochlorid (**R-105**) (0,23 g, 0,90 mmol), indem unter Argonatmosphäre eine Lösung in DCM (17,0 mL) hergestellt wurde, die vor der Zugabe von Pyridin (1,25 mL) auf 0 °C gekühlt wurde. Im Anschluss wurde eine Lösung bestehend aus Triphosgen (216 mg) in DCM (6,0 mL) tropfenweise hinzugegeben und das Reaktionsgemisch bei 0 °C für 3 Std gerührt. Der Ansatz wird mit DCM verdünnt und die organischen Phasen mit HCl (1 N) gewaschen, über (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) getrocknet und das LM am Rotationsverdampfer abgezogen. SC (Ethylacetat) ergab einen Feststoff (0,11 g; 0,44 mmol;

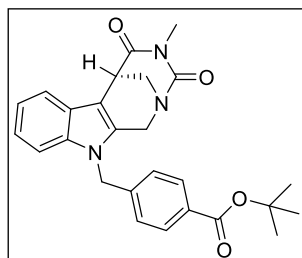
49 %). Smp.: 260,8 - 263,0 °C. IR (KBr): 3266; 1729; 1675 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.13 (s, 1H, NH (Indol)), 7.47 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.34 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.11 – 6.99 (m, 2H, Ar-H), 4.66 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>C), 3.89 (dd, *J* = 13.2, 1.2 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.82 (s, 1H, NCH<sub>2</sub>CH), 3.44 (dd, *J* = 13.1, 2.3 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 2.88 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 173.76 (quart. CO), 161.53 (quart. CO), 136.01 (quart. Ar-C), 133.59 (quart. Ar-C), 126.25 (quart. Ar-C), 121.91 (+, Ar-CH), 119.77 (+, Ar-CH), 117.94 (+, Ar-CH), 112.05 (+, Ar-CH), 105.34 (quart. Ar-C), 50.10 (–, NCH<sub>2</sub>C), 46.97 (–, NCH<sub>2</sub>CH), 36.53 (+, NCH<sub>2</sub>CH), 27.83 (+, NCH<sub>3</sub>).

**HPLC** (Chiracel OD-H, Hexan 85 %; 15 % <sup>i</sup>Prop., 0,6 mL / min, 1 μL, 220 nm): *t*<sub>R</sub> = 37,2 min *R*-Enantiomer, *t*<sub>R</sub> = 44,3 min *S*-Enantiomer; ≥ 96 % ee, [α]<sub>589</sub><sup>20</sup> – 136,2 (c 0,1; MeOH). MS (C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 256 [MH<sup>+</sup>] (100). Anal. (C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) ber.: C 65,87; H 5,13; N 16,46; gef.: C 65,69; H 5,26; N 16,22.

***tert*-Butyl 4-(((6*R*)-4-Methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoate (*R*-22a)**

**C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (M = 445,20 g/mol)**



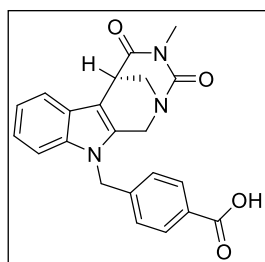
Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an **AV5b**, ausgehend von einer Mischung bestehend aus (6*R*)-4-Methyl-6,11-dihydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-3,5(1*H*,4*H*)-dion (**R-20a**) (0,64 g, 2,52 mmol), *tert*-Butyl 4-(bromomethyl)benzoat (**21**) (0,82 g, 3,0 mmol) und K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,42 g, 3,0 mmol) in 2-Butanon (30,0 mL),

welche für 16 Std bei 80 °C erhitzt wurde. Daraufhin lässt man den Reaktionsansatz auf Raumtemperatur abkühlen, der Feststoff (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) wird abfiltriert und das LM unter reduziertem Druck entfernt. SC (DCM / Ethylacetat (3:1)) ergab einen Feststoff (0,82 g, 1,84 mmol; 73 %). Smp.: 96,4 - 97,0 °C. IR (KBr): 1712; 1688 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.82 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.53 (dd, *J* = 6.7, 1.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.40 (dd, *J* = 7.0, 1.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.16 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.15 – 7.05 (m, 2H, Ar-H), 5.44 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar (Benzyl)), 4.83 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.54 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 3.90 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.88 (s, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.45 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 2.90 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.51 (s, 9H, OC (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  173.57 (quart.  $\text{C=O}$ ), 165.07 (quart.  $\text{C=O}$ ), 161.32 (quart.  $\text{C=O}$ ), 143.10 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 136.45 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 134.74 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 130.92 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 129.89 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 127.25 (+, (Ar- $\text{CH}$ )<sub>2</sub>), 126.18 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 122.29 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 120.33 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 118.33 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 110.75 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 105.94 (quart. Ar- $\text{C}$ ), 81.17 (quart.  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 49.37 (-,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ), 46.68 (-,  $\text{NCH}_2\text{Ar}$  (Benzyl)), 46.50 (-,  $\text{NCH}_2\text{C}$ ), 36.48 (+, Ar- $\text{CH}$ ), 28.22 (+,  $(\text{OC}(\text{CH}_3)_3)$ ), 27.89 (+,  $\text{NCH}_3$ ).  $[\alpha]_{589}^{20} - 115,6$  (c 0,1; MeOH). MS ( $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4$ , LC-MS, ESI)  $m/z$  (%): 390  $[\text{MH}^+ - \text{C}_4\text{H}_8]$  (100), 446  $[\text{MH}^+]$  (12,11). Anal. ( $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4$ ) ber.: C 70,09; H 6,11; N 9,43; gef.: C 70,32; H 6,07; N 9,43.

**4-(((6R)-4-Methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoesäure (*R*-23a)**

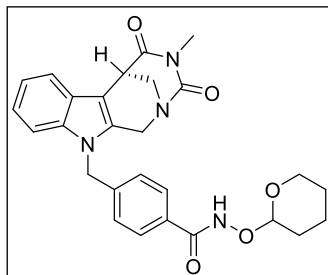
$\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$  ( $M = 389,14$  g/mol)



Ausgehend von *tert*-Butyl 4-(((6*R*)-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano-[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoat (*R*-22a) (1,21 g; 2,73 mmol) wurde zunächst eine Lösung in DCM (20 mL) hergestellt, zu der dann  $\text{CF}_3\text{COOH}$  (10 mL) hinzuge tropft und diese dann für 2,5 Std bei Raumtemperatur gerührt wurde (DC-Kontrolle). Extraktion (DCM /  $\text{H}_2\text{O}$ ) und Kristallisation (Diethylether) ergaben einen Feststoff (0,89 g, 2,29 mmol; 84 %). Smp.: 244,0 – 247,4 °C. IR (KBr): 1725; 1694  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  12.96 (s, 1H), 7.86 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.53 (dd,  $J = 6.4, 2.2$  Hz, 1H), 7.42 (dd,  $J = 6.7, 1.8$  Hz, 1H), 7.16 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.13 – 7.06 (m, 2H), 5.45 (s, 2H), 4.83 (d,  $J = 16.6$  Hz, 1H), 4.55 (d,  $J = 16.5$  Hz, 1H), 3.90 (d,  $J = 11.9$  Hz, 2H), 3.45 (dd,  $J = 13.4, 2.5$  Hz, 1H), 2.89 (s, 3H).  $[\alpha]_{589}^{20} - 141,7$  (c 0,1; MeOH). MS ( $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$ , LC-MS, ESI)  $m/z$  (%): 390  $[\text{MH}^+]$  (100). Anal. ( $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$ ) ber.: C 67,86; H 4,92; N 10,79; gef.: C 67,56; H 5,14; N 10,50.

**4-(((6R)-4-Methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (*R*-26a)**

**C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (M = 488,21 g/mol)**

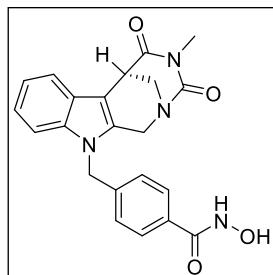


Die Synthese erfolgte in Anlehnung an **AV7**: Zu einer Lösung bestehend aus 4-(((6*R*)-4-Methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoesäure (**R-23a**) (0,89 g, 2,28 mmol) in THF (15,0 mL) werden *N,N*-Diisopropylethylamin (0,89 mL), NH<sub>2</sub>OTHP **25** (0,80 g, 6,84 mmol) und BOP **24** (1,01 g, 2,28 mmol) hinzugegeben und diese Mischung für 2 Std bei Raumtemperatur gerührt. Zum Stoppen der Reaktion wird die Mischung auf H<sub>2</sub>O (100 mL) geschüttet, extrahiert (Ethylacetat; 3 x 20 mL), über (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) getrocknet und das LM unter reduziertem Druck vollständig entfernt. Der verbliebene Rückstand wurde in MeOH (10 mL) suspendiert und für 1 Std bei 40 °C unter ständigem Rühren mazeriert. Die methanolische Lösung wurde dann im Anschluss abdekantiert und der Feststoff *in vacuo* getrocknet. Man erhielt einen Schaum (0,47 g, 0,96 mmol; 42 %). Smp.: 228,3 - 230,1 °C. IR (KBr): 2942; 1723; 1678 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.58 (s, 1H), 7.68 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.55 – 7.50 (m, 1H), 7.41 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.14 – 7.05 (m, 2H), 5.48 – 5.36 (m, 2H), 4.96 (s, 1H), 4.86 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 4.56 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 4.02 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.90 (d, *J* = 13.9 Hz, 2H), 3.55 – 3.41 (m, 2H), 2.90 (s, 3H), 1.61 (d, *J* = 68.6 Hz, 6H).

**HPLC** (Phenomenex Lux Cellulose-2, MeOH 90 %, 10 % *i*Prop., 0,5 mL / min, 10 µL, 215 nm): *t<sub>R</sub>* = 20 - 26,2 min *R*-Enantiomer, *t<sub>R</sub>* = 26,2 - 32,0 min *S*-Enantiomer; > 96 % ee, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup><sub>589</sub> – 133,6 (c 0,1; Aceton). MS (C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 405 [MH<sup>+</sup> - 3,4-dihydro-2*H*-pyran] (100), 489 [MH<sup>+</sup>] (8,44). Anal. (C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>) ber.: C 66,38; H 5,78; N 11,47; gef.: C 66,00; H 6,06; N 11,25.

***N*-Hydroxy-4-(((6*R*)-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzamid (*R*-13a)**

**C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (M = 404,15 g/mol)**

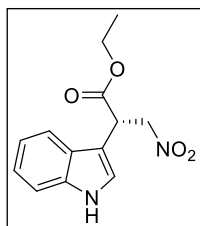


Die Synthese erfolgte ausgehend von einer Mischung bestehend aus 4-(((6*R*)-4-Methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]-diazocino-[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (***R*-26a**) (40 mg, 0,082 mmol) in MeOH / THF (10 mL; 1:1). Nach Zugabe einer katalytischen Menge an Amberlyst 15<sup>141</sup> wurde die Mischung für 24 Std bei Raumtemperatur gerührt (DC-Kontrolle). Der Amberlyst wurde abfiltriert, das LM am Rotationsverdampfer abgezogen und der Feststoff *in vacuo* getrocknet. Kristallisation (Diethylether) ergab einen Feststoff (0,2 g, 0,5 mmol; 52 %). Smp.: 145,4 - 146,1 °C. IR (KBr): 1727; 1683 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.15 (s, 1H, NHOH), 7.66 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.53 (dd, *J* = 6.8, 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.41 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.13 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.12 – 7.05 (m, 2H, Ar-H), 5.41 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar (Benzyl)), 4.86 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.57 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 3.93 – 3.87 (m, 2H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.66 (dd, *J* = 12.9, 1.9 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 2.90 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 173.59 (quart. CO), 161.33 (quart. CO), 164.32 (quart. CO), 141.19 (quart. Ar-C), 136.40 (quart. Ar-C), 134.75 (quart. Ar-C), 132.38 (quart. Ar-C), 127.72 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 127.10 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 126.19 (quart. Ar-C), 122.26 (+, Ar-CH), 120.32 (+, Ar-CH), 118.33 (+, Ar-CH), 110.81 (+, Ar-CH), 105.82 (quart. Ar-C), 49.41 (–, NCH<sub>2</sub>C), 46.70 (–, NCH<sub>2</sub>CH), 46.47 (–, NCH<sub>2</sub>Ar (Benzyl)), 36.49 (+, NCH<sub>2</sub>CH), 27.89 (+, NCH<sub>3</sub>). [α]<sub>589</sub><sup>20</sup> – 136,2 (c 0,1; MeOH). MS (C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 405 [MH<sup>+</sup>] (100). Anal. (C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>) ber.: C 65,34; H 4,98; N 13,85; gef.: C 65,15; H 4,99; N 13,71.

**(S)-Ethyl 2-(1*H*-indol-3-yl)-3-nitropropanoat (*S*-102)**

**C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M = 262,10 g/mol)**

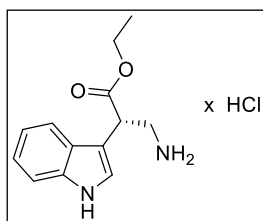


Die Synthese erfolgte, wie für das *R*-Enantiomer **R-102** und in der Lit.<sup>135</sup> beschrieben, ausgehend von *N*-((1*S*,2*R*)-2-Hydroxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-yl)quinolin-2-carbothioamid (**96b**) zur Synthese des entsprechenden chiralen Katalysators. SC (DCM / n-Hexan / Ethylacetat (1:5:1)) ergab ein gelbes Öl (1,91 g, 8,23 mmol; 48 %).

**HPLC** (Chiracel OD-H, Hexan 85 %; 15 % <sup>i</sup>Prop., 0,6 mL / min, 1 µL, 220 nm): *t<sub>R</sub>* = 107,9 min *S*-Enantiomer, *t<sub>R</sub>* = 90,8 min *R*-Enantiomer; ≥ 99 % ee, [α]<sub>589</sub><sup>20</sup> – 112,070 (c 1,0; DCM). Lit.<sup>135</sup>: [α]<sub>589</sub><sup>20</sup> – 110,0 (c 1,0; DCM).

**(S)-Ethyl 3-amino-2-(1*H*-indol-3-yl)propanoat hydrochlorid (*S*-103)**

**C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M = 268,10 g/mol)**

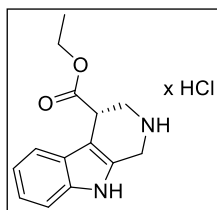


Die Synthese erfolgte, wie für das *R*-Enantiomer **R-103** beschrieben, ausgehend von (*S*)-Ethyl 2-(1*H*-indol-3-yl)-3-nitropropanoat (**S-102**) (1,92 g, 7,32 mmol). SC (DCM / MeOH (5:1)+1 % NH<sub>3</sub>) und ansäuern (5-6 N HCl(<sub>i</sub>prop)) ergaben einen Schaum (1,5 g, 6,46 mmol; 88 %).

IR (KBr): 3310; 3021; 2975; 1730 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.26 (s, 1H), 8.13 (s, 2H), 7.58 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.15 – 6.99 (m, 2H), 4.30 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.10 (q, *J* = 10.8, 7.1 Hz, 2H), 3.47 (dd, *J* = 12.7, 8.1 Hz, 1H), 3.15 (dd, *J* = 12.8, 6.7 Hz, 1H), 1.12 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). [α]<sub>589</sub><sup>20</sup> – 86,9 (c 0,1; MeOH). HRMS (C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ESI-MS) *m/z*: ber.: 233,1285 [MH<sup>+</sup>], gef.: 233,1288 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode B): 99,4 %, *t<sub>R</sub>* = 6,9 min.

**(S)-Ethyl 2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat hydrochlorid (*S*-104)**

**C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M = 280,10 g/mol)**



Die Darstellung erfolgte, wie für das *R*-Enantiomer **R-104** beschrieben, ausgehend von (*S*)-Ethyl 3-amino-2-(1*H*-indol-3-yl)propanoat hydrochlorid (**S-103**) (1,4 g, 6,03 mmol). Kristallisation (Diethylether) ergab einen Feststoff (1,0 g, 3,56 mmol; 58 %). Smp.: 268,8 - 271,4 °C. IR (KBr):

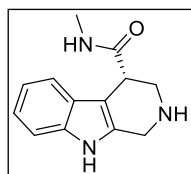
3200; 1730 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.35 (s, 1H), 9.64 (s, 1H), 7.56 (d,

$J = 7.7$  Hz, 1H), 7.39 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.16 – 7.00 (m, 2H), 4.42 – 4.28 (m, 2H), 4.23 (dd,  $J = 10.2, 4.1$  Hz, 1H), 4.21 – 4.09 (m, 2H), 3.69 (dd,  $J = 12.8, 4.7$  Hz, 1H), 3.52 (dd,  $J = 12.9, 5.3$  Hz, 1H), 1.22 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H).

**HPLC** (Chiracel OD-H, Hexan 85 %, 15 %  $i$ Prop., 0,6 mL / min, 1  $\mu$ L, 220 nm):  $t_R = 17,7$  min *S*-Enantiomer,  $t_R = 19,3$  min *R*-Enantiomer;  $\geq 99$  % ee.  $[\alpha]^{20}_{589} - 97,2$  (c 0,1; MeOH). MS ( $C_{14}H_{16}N_2O_2$ , LC-MS, ESI)  $m/z$  (%): 245  $[MH^+]$  (100). Anal. ( $C_{14}H_{17}ClN_2O_2$ ) ber.: C 59,89; H 6,10; N 9,98; gef.: C 59,92; H 6,16; N 9,90.

### (*S*)-*N*-Methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxamid (**S-105**)

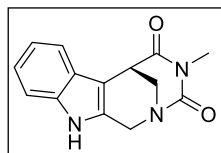
$C_{13}H_{15}N_3O$  (M = 229,12 g/mol)



Die Darstellung erfolgte, wie für das *R*-Enantiomer **R-105** beschrieben, ausgehend von (*S*)-Ethyl 2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat hydrochlorid (**S-104**) (0,408 g, 1,45 mmol). SC (SiO<sub>2</sub>; DCM / MeOH / NH<sub>3</sub><sub>konz</sub> 5:1:1 %) („dryload“-Methode) gab einen Schaum (0,24 g, 1,05 mmol; 72 %). Smp.: 239,3 – 241,2 °C. IR (KBr): 2926; 1653 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  10.81 (s, 1H), 7.99 – 7.91 (m, 1H), 7.35 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.27 (d,  $J = 7.1$  Hz), 7.04 – 6.87 (m, 2H), 3.94 – 3.78 (m, 2H), 3.51 (t,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 3.18 – 3.15 (m, 1H), 3.10 (dd,  $J = 12.9, 4.5$  Hz, 1H), 2.98 (dd,  $J = 12.9, 4.8$  Hz, 1H), 2.59 (d,  $J = 4.6$  Hz, 3H).  $[\alpha]^{20}_{589} - 25,0$  (c 0,1; MeOH). HRMS ( $C_{13}H_{15}N_3O$ , ESI-MS)  $m/z$ : ber.: 230,1288  $[MH^+]$ , gef.: 230,1288  $[MH^+]$ . RP-HPLC (220 nm, Methode B): 99,2 %,  $t_R = 5,7$  min.

### (6*S*)-4-Methyl-6,11-dihydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-3,5(1*H*,4*H*)-dion (**S-20a**)

$C_{14}H_{13}N_3O_2$  (M = 255,10 g/mol)



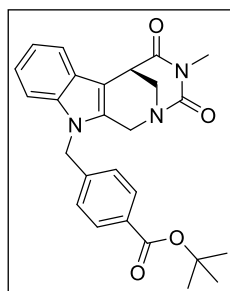
Die Synthese erfolgte, wie für das *R*-Enantiomer **R-20a** beschrieben, ausgehend von (*S*)-*N*-Methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxamid (**S-105**) (0,24 g, 1,05 mmol). SC (Ethylacetat) ergab einen Feststoff (0,12 g, 0,47 mmol; 45 %). Smp.: 251,4 – 254,0 °C. IR (KBr): 3266, 1729, 1675 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  11.13 (s, 1H, NH (Indol)), 7.47 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, Ar-H), 7.34 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, Ar-H), 7.11 – 7.00 (m, 2H, Ar-H), 4.66 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>C), 3.89 (dd,  $J = 13.2, 1.2$  Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.82 (s, 1H, NCH<sub>2</sub>CH), 3.44 (dd,  $J = 13.1, 2.3$  Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 2.88 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  173.76 (quart.  $\underline{\text{CO}}$ ), 161.53 (quart.  $\underline{\text{CO}}$ ), 136.01 (quart. Ar- $\underline{\text{C}}$ ), 133.59 (quart. Ar- $\underline{\text{C}}$ ), 126.25 (quart. Ar- $\underline{\text{C}}$ ), 121.91 (+, Ar- $\underline{\text{CH}}$ ), 119.76 (+, Ar- $\underline{\text{CH}}$ ), 117.94 (+, Ar- $\underline{\text{CH}}$ ), 112.05 (+, Ar- $\underline{\text{CH}}$ ), 105.34 (quart. Ar- $\underline{\text{C}}$ ), 50.10 (–, N $\underline{\text{CH}_2\text{C}}$ ), 46.97 (–, N $\underline{\text{CH}_2\text{CH}}$ ), 36.53 (+, N $\underline{\text{CH}_2\text{CH}}$ ), 27.83 (+, N $\underline{\text{CH}_3}$ ).

**HPLC** (Chiracel OD-H, Hexan 85 %, 15 %  $^i\text{Prop.}$ , 0,6 mL / min, 1  $\mu\text{L}$ , 220 nm):  $t_{\text{R}}$  = 41,7 min *S*-Enantiomer,  $t_{\text{R}}$  = 37,9 min *R*-Enantiomer;  $\geq 96$  % ee.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 136,2$  (c 0,1; MeOH). MS ( $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$ , LC-MS, ESI)  $m/z$  (%): 256 [ $\text{MH}^+$ ] (100). Anal. ( $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$ ) ber.: C 65,87; H 5,13; N 16,46; gef.: C 65,62; H 5,22; N 16,19.

***tert*-Butyl 4-(((6*S*)-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoate (*S*-22a)**

$\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4$  ( $M = 445,20$  g/mol)



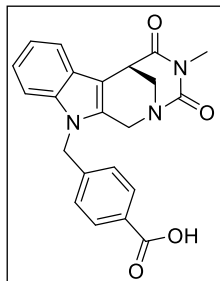
Die Synthese erfolgte, wie für das *R*-Enantiomer ***R*-22a** beschrieben, ausgehend von (6*S*)-4-Methyl-6,11-dihydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-3,5(1*H*,4*H*)-dion (***S*-20a**) (0,52 g, 2,04 mmol). SC (DCM / Ethylacetat (3:1)) ergab einen Feststoff (0,71 g, 1,59 mmol; 78 %). Smp.: 96,7 - 97,4 °C. IR (KBr): 1711; 1688  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7.82 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 7.55 – 7.51 (m, 1H, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 7.42 – 7.38 (m, 1H, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 7.16 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 7.14 – 7.05 (m, 2H, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 5.44 (s, 2H, N $\underline{\text{CH}_2\text{Ar}}$  (Benzyl)), 4.83 (d,  $J = 16.6$  Hz, 1H, N $\underline{\text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{BC}}$ ), 4.54 (d,  $J = 16.5$  Hz, 1H, N $\underline{\text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{BC}}$ ), 3.92 – 3.86 (m, 2H, N $\underline{\text{CH}_\text{AH}_\text{BCH}}$ , N $\underline{\text{CH}_\text{AH}_\text{BCH}}$ ), 3.45 (d,  $J = 11.1$  Hz, 1H, N $\underline{\text{CH}_\text{AH}_\text{BCH}}$ ), 2.90 (s, 3H, N $\underline{\text{CH}_3}$ ), 1.51 (s, 9H, OC ( $\underline{\text{CH}_3}$ )<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  173.58 (quart.  $\underline{\text{CO}}$ ), 165.07 (quart.  $\underline{\text{CO}}$ ), 161.32 (quart.  $\underline{\text{CO}}$ ), 143.10 (quart. Ar- $\underline{\text{C}}$ ), 136.45 (quart. Ar- $\underline{\text{C}}$ ), 134.74 (quart. Ar- $\underline{\text{C}}$ ), 130.92 (quart. Ar- $\underline{\text{C}}$ ), 129.89 (+, Ar- $\underline{\text{CH}}$ ), 127.25 (+, (Ar- $\underline{\text{CH}}$ )<sub>2</sub>), 126.19 (quart. Ar- $\underline{\text{C}}$ ), 122.29 (+, Ar- $\underline{\text{CH}}$ ), 120.33 (+, Ar- $\underline{\text{CH}}$ ), 118.33 (+, Ar- $\underline{\text{CH}}$ ), 110.75 (+, Ar- $\underline{\text{CH}}$ ), 105.94 (quart. Ar- $\underline{\text{C}}$ ), 81.17 (quart. OC( $\underline{\text{CH}_3}$ )<sub>3</sub>), 49.37 (–, N $\underline{\text{CH}_2\text{CH}}$ ), 46.68 (–, N $\underline{\text{CH}_2\text{Ar}}$  (Benzyl)), 46.50 (–, N $\underline{\text{CH}_2\text{C}}$ ), 36.48 (+, Ar- $\underline{\text{CH}}$ ), 28.22 (+, (OC( $\underline{\text{CH}_3}$ )<sub>3</sub>), 27.89 (+, N $\underline{\text{CH}_3}$ ).  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 155,6$  (c 0,1; MeOH). MS ( $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4$ , LC-MS, ESI)  $m/z$  (%): 390 [ $\text{MH}^+ - \text{C}_4\text{H}_8$ ] (100), 446 [ $\text{MH}^+$ ] (13,55). Anal. ( $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4$ ) ber.: C 70,09; H 6,11; N 9,43; gef.: C 70,26; H 5,99; N 9,42.



**4-(((6S)-4-Methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoesäure (*S*-23a)**

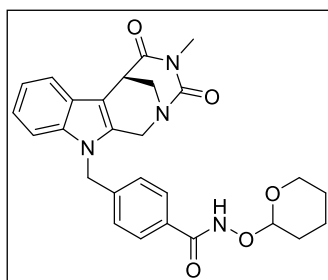
**C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (M = 389,14 g/mol)**



Die Darstellung erfolgte, wie für das *R*-Enantiomer ***R*-23a** beschrieben, ausgehend von *tert*-Butyl 4-(((6*S*)-4-Methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoat (***S*-22a**) (0,71 g, 1,59 mmol). Extraktion (DCM / H<sub>2</sub>O) und Kristallisation (Diethylether) ergaben einen Feststoff (0,31 g, 0,80 mmol; 50 %). Smp.: 241,8-243,7 °C. IR (KBr): 1725; 1693 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.93 (s, 1H), 7.86 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.56 – 7.50 (m, 1H), 7.42 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.18-7.14 (m, 2H), 7.15 – 7.04 (m, 2H), 5.45 (s, 2H), 4.83 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 4.55 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 3.90 (d, *J* = 12.6 Hz, 2H), 3.45 (dd, *J* = 13.6, 2.5 Hz, 1H), 2.90 (s, 3H). [α]<sub>589</sub><sup>20</sup> +141,7 (c 0.1; MeOH). MS (C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 390 [MH<sup>+</sup>] (100). Anal. (C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) ber.: C 67,86; H 4,92; N 10,79; gef.: C 67,54; H 4,93; N 10,48.

**4-(((6S)-4-Methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (*S*-26a)**

**C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (M = 488,21 g/mol)**



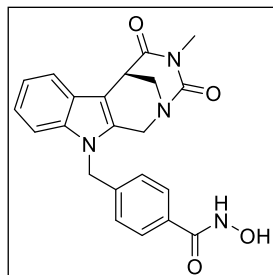
Die Darstellung erfolgte, wie für das *R*-Enantiomer ***R*-26a** beschrieben, ausgehend von 4-(((6*S*)-4-Methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoesäure (***S*-23a**) (0,31 g, 0,80 mmol). Man erhielt einen Schaum (0,22 g, 0,45 mmol; 56 %). IR (KBr): 2944; 1723; 1679 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.86 (s, 1H), 7.76 – 7.71 (m, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.23 – 7.15 (m, 3H), 7.05 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 5.30 (dd, *J* = 16.9, 9.4 Hz, 1H), 5.19 – 5.12 (m, 1H), 5.08 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H), 4.83 (dd, *J* = 16.3, 8.2 Hz, 1H), 4.27 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 4.03 – 4.06 (m, 1H), 3.95 – 3.85 (m, 2H), 3.68 – 3.58 (m, 1H), 3.37 – 3.28 (m, 1H), 3.04 (s, 3H), 1.90 – 1.50 (m, 6H).

**HPLC** (Phenomenex Lux Cellulose-2, MeOH 90 %, 10 % *i*Prop., 0,5 mL / min, 10 µL, 215 nm): *t<sub>R</sub>* = 20 - 26,2 min *S*-Enantiomer, *t<sub>R</sub>* = 26,2 - 32,0 min *R*-Enantiomer; ≥ 96 % ee. [α]<sub>589</sub><sup>20</sup> + 133,6 (c 0,1; C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O). MS (C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%):

405 [MH<sup>+</sup> - 3,4-dihydro-2*H*-pyran] (100), 489 [MH<sup>+</sup>] (10). Anal. (C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>) ber.: C 66,38; H 5,78; N 11,47; gef.: C 66,00; H 6,08; N 11,26.

***N*-Hydroxy-4-(((6*S*)-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzamid (*S*-13a)**

**C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (M = 404,15 g/mol)**



Die Synthese erfolgte, wie für das *R*-Enantiomer ***R*-13a** beschrieben, ausgehend von 4-(((6*S*)-4-Methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (***S*-26a**) (0,22 g, 0,45 mmol). Kristallisation (Diethylether) ergab einen Feststoff (0,12 g, 0,3 mmol;

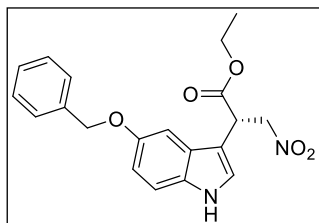
67 %). Smp.: 146,0 - 147,2 °C. IR (KBr): 1727; 1681 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.15 (s, 1H, NHOH), 9.00 (s, 1H, NHOH), 7.65 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.55 – 7.50 (m, 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.40 (dd, 1H, Ar-H), 7.12 (d, 8.1 Hz, 2H, Ar-H), 7.10 – 7.04 (m, 2H, Ar-H), 5.41 (s, 2H, NCH2Ar (Benzyl)), 4.84 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H, NCHAHBC), 4.56 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, NCHAHBC), 3.92 – 3.84 (m, 2H, NCHAHBCH), 3.48 – 3.42 (m, 1H, NCHAHBCH), 2.88 (s, 3H, NCH3).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 173.59 (quart. CO), 164.30 (quart. CO), 161.34 (quart. CO), 141.19 (quart. Ar-C), 136.40 (quart. Ar-C), 132.40 (quart. Ar-C), 134.75 (quart. Ar-C), 127.72 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 127.10 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 126.19 (quart. Ar-C), 122.26 (+, Ar-CH), 120.32 (+, Ar-CH), 118.33 (+, Ar-CH), 110.81 (+, Ar-CH), 105.82 (quart. Ar-C), 49.41 (–, NCH2C), 46.69 (–, NCH2CH), 46.47 ((–, NCH2Ar (Benzyl)), 36.49 (+, NCH2CH), 27.89 (+, NCH3). [α]<sub>589</sub><sup>20</sup> + 136,2 (c 0,1; MeOH). MS (C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 405 [MH<sup>+</sup>] (100). Anal. (C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>) ber.: C 65,34; H 4,98; N 13,85; gef.: C 65,27; H 5,02; N 13,62.

#### 9.4.10.2 *S*- und *R* wasserlösliche Verbindungen *S*-13h und *R*-13h

##### Ethyl (*S*)-2-(5-(benzyloxy)-1*H*-indol-3-yl)-3-nitropropanoat (*S*-108)

$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5$  ( $M = 368,14 \text{ g/mol}$ )

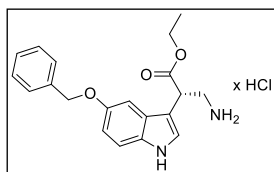


Die Synthese erfolgte, wie für das *S*-Enantiomer **S-102** beschrieben, ausgehend von 5-(Benzyloxy)-1*H*-indol (**14b**) (2,79 g, 12,50 mmol), welches käuflich erworben wurde. SC (DCM / n-Hexan / Ethylacetat (1:5:1)) ergab einbraunes Öl (3,00 g, 8,15 mmol; 65 %). IR (ATR): 1726; 1552  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  11.07 (s, 1H), 7.49 (d,  $J = 6.9 \text{ Hz}$ , 2H), 7.44 – 7.32 (m, 3H), 7.30 – 7.27 (m, 3H), 6.85 (dd,  $J = 8.8, 2.4 \text{ Hz}$ , 1H), 5.24 (dd,  $J = 15.0, 10.7 \text{ Hz}$ , 1H), 5.11 (s, 2H), 4.90 (dd,  $J = 15.1, 4.8 \text{ Hz}$ , 1H), 4.67 (dd,  $J = 10.6, 4.7 \text{ Hz}$ , 1H), 4.21 – 3.95 (m, 2H), 1.12 (t,  $J = 7.1 \text{ Hz}$ , 3H).

**HPLC** (Chiracel OD-H, Hexan 90 %, 10 %  $^i\text{Prop.}$ , 0,6 mL / min, 5  $\mu\text{L}$ , 220 nm):  $t_R = 134,5 \text{ min}$  *S*-Enantiomer,  $t_R = 152,5 \text{ min}$  *R*-Enantiomer;  $\geq 99 \%$  ee.  $[\alpha]_{589}^{20} - 87,3$  (c 0,1; MeOH). HRMS ( $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5$ , ESI-MS)  $m/z$ : ber.: 369,1445 [ $\text{MH}^+$ ], gef.: 369,1445 [ $\text{MH}^+$ ]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 100,0 %,  $t_R = 21,6 \text{ min}$ .

##### Ethyl (*S*)-3-amino-2-(5-(benzyloxy)-1*H*-indol-3-yl)propanoat hydrochlorid (*S*-109)

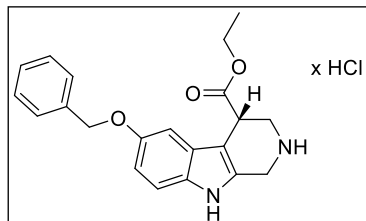
$\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}_3$  ( $M = 374,14 \text{ g/mol}$ )



Die Darstellung erfolgte ausgehend von Ethyl (*S*)-2-(5-(benzyloxy)-1*H*-indol-3-yl)-3-nitropropanoat (**S-108**) (4,90 g, 13,31 mmol) nach **AV1**. SC (DCM / MeOH (5:1)+1 %  $\text{NH}_3$ ) und ansäuern (5-6 N  $\text{HCl}_{(\text{i} \text{prop})}$ ) ergaben ein gelbes Öl (4,12 g, 10,99 mmol; 83 %). IR (ATR): 3400; 2908; 1721  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  11.10 (d,  $J = 2.1 \text{ Hz}$ , 1H), 8.11 (s, 3H), 7.48 (d,  $J = 6.9 \text{ Hz}$ , 2H), 7.44 – 7.28 (m, 4H), 7.24 (dd,  $J = 14.5, 2.4 \text{ Hz}$ , 2H), 6.86 (dd,  $J = 8.8, 2.3 \text{ Hz}$ , 1H), 5.10 (s, 2H), 4.25 (t,  $J = 7.2 \text{ Hz}$ , 1H), 4.09 (q,  $J = 10.8, 7.1 \text{ Hz}$ , 2H), 3.52 – 3.40 (m, 1H), 3.19 – 3.06 (m, 1H), 1.13 (t,  $J = 7.1 \text{ Hz}$ , 3H).  $[\alpha]_{589}^{20} - 69,3$  (c 0,1; MeOH). HRMS ( $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$ , ESI-MS)  $m/z$ : ber.: 339,1703 [ $\text{MH}^+$ ], gef.: 339,1703 [ $\text{MH}^+$ ]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 99,3 %,  $t_R = 7,2 \text{ min}$ .

**Ethyl (*S*)-6-(benzyloxy)-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat hydrochlorid (*S*-110)**

**C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (M = 386,14 g/mol)**



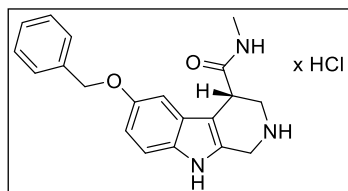
Die Synthese erfolgte ausgehend von Ethyl (*S*)-3-amino-2-(5-(benzyloxy)-1*H*-indol-3-yl)propanoat hydrochlorid (**S-109**) (4,12 g, 10,99 mmol), der **AV2** folgend, wobei der Reaktionsansatz nicht auf 60 °C erhitzt wurde. Das Produkt

präzipitierte über Nacht bei Raumtemperatur als Feststoff. Das Versetzen der Mutterlauge mit Ether führte zu einer weiteren Erhöhung der Ausbeute. Gesamtausbeute (2,82 g, 7,29 mmol; 66 %). Smp.: 262,7 °C. IR (KBr): 2922; 2797; 1719 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.19 (s, 1H), 10.10 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 7.47 – 7.41 (m, 2H), 7.41 – 7.35 (m, 2H), 7.34 – 7.27 (m, 2H), 7.12 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.85 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 5.07 (q, *J* = 12.0 Hz, 2H), 4.37 – 4.25 (m, 2H), 4.16 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 4.15 – 4.04 (m, 2H), 3.67 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 3.49 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 1.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

**HPLC** (Chiracel OD-H, Hexan 90 %, 10 % <sup>i</sup>Prop., 0,6 mL / min, 5 µL, 220 nm): *t<sub>R</sub>* = 83,3 min *S*-Enantiomer, *t<sub>R</sub>* = 110,2 min *R*-Enantiomer; ≥ 99 % ee. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup><sub>589</sub> - 126,5 (c 0,1; MeOH). HRMS (C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ESI-MS) *m/z*: ber.: 351,1703 [MH<sup>+</sup>], gef.: 351,1705 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 99,4 %, *t<sub>R</sub>* = 8,0 min.

**(*S*)-6-(Benzyloxy)-*N*-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxamid hydrochlorid (*S*-111)**

**C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (M = 371,14 g/mol)**



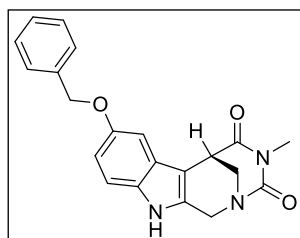
Die Synthese erfolgte nach der für **R-105** beschriebenen Arbeitsvorschrift ausgehend von Ethyl (*S*)-6-(benzyloxy)-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat hydrochlorid (**S-110**) (0,40 g, 1,03 mmol). Die Mischung bestehend aus

DCM / MeOH (1:1; 10 mL), DMSO (8 Tropfen) und DMF (6,9 mL) wurde auf 0 °C gekühlt und durch Zugabe einer methanolischen Methyamin-Lösung (30 %, 19,0 mL) und NaCN (0,304 g) gestartet. Das Reaktionsgemisch wurde für 6 Tage bei 4 °C gerührt und der Reaktionsfortschritt mittels DC-Kontrolle (DCM / MeOH 5:1 + 1 % NH<sub>3</sub><sub>conz</sub>) überwacht. Nach 6 Tagen wird das LM im Ölpumpenvakuum schonend abgezogen und der Rückstand auf Kieselgel aufgezogen. SC (SiO<sub>2</sub>; DCM / MeOH / NH<sub>3</sub><sub>conz</sub> 5:1:1 %) („dryload“-Methode)

ergab einen Feststoff (0,254 g, 0,68 mmol; 66 %). Smp.: 178,4 °C. IR (KBr): 2940; 1637 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.65 (s, 1H), 7.94 – 7.88 (m, 1H), 7.46 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.42 – 7.31 (m, 3H), 7.17 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.73 (dd, *J* = 8.7, 2.4 Hz, 1H), 5.04 (s, 2H), 3.91 – 3.75 (m, 2H), 3.44 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 3.11 (dd, *J* = 13.0, 4.1 Hz, 1H), 2.94 (dd, *J* = 12.9, 4.8 Hz, 1H), 2.58 (d, *J* = 4.5 Hz, 3H). [α]<sub>589</sub><sup>20</sup> - 35,6 (c 0,1; MeOH). HRMS (C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, ESI-MS) *m/z*: ber.: 336,1707 [MH<sup>+</sup>], gef.: 336,1705 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 98,7 %, *t*<sub>R</sub> = 6,2 min.

**(6*S*)-8-(Benzyloxy)-4-methyl-6,11-dihydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-3,5(1*H*,4*H*)-dion (S-20b)**

**C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (M = 361,14 g/mol)**



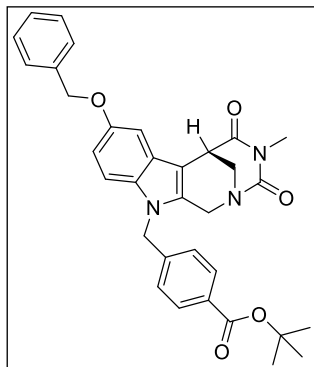
Die Darstellung erfolgte ausgehend von 6-(Benzyloxy)-*N*-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxamid hydrochlorid (**S-111**) (0,163 g, 0,44 mmol) analog zu der für **R-20a** beschriebenen Arbeitsvorschrift, nur mit dem Unterschied das zunächst die Base freigesetzt werden musste. Dafür erfolgte eine Alkalisierung mit

verdünnter 25 % NH<sub>3</sub>-Lösung (1:1) (5 Tropfen) und die Abtrennung des Ammoniumchlorides durch Extraktion (DCM, 3 x 50 mL). SC (Ethylacetat, „dryload“-Methode) ergab einen Feststoff (0,128 g, 0,35 mmol; 80 %). Smp.: 273,6 °C. IR (KBr): 3281; 1730; 1673 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.03 (s, 1H, NH (Indol)), 7.50 – 7.45 (m, 2H, Ar-H), 7.42 – 7.30 (m, 3H, Ar-H), 7.23 – 7.19 (m, 2H, Ar-H), 6.92 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 5.10 (d, *J* = 3.2 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.87 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.50 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 3.90 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.83 (br s, 1H, NCH<sub>2</sub>CH), 3.37 (dd, *J* = 13.1, 2.2 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.07 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 173.23 (quart. C=O), 161.49 (quart. C=O), 154.03 (quart. Ar-C), 137.40 (quart. Ar-C), 132.48 (quart. Ar-C), 130.90 (quart. Ar-C), 128.53 (+, Ar-CH), 127.85 (+, Ar-CH), 127.69 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 126.61 (quart. Ar-C), 113.63 (+, Ar-CH), 112.04 (+, Ar-CH), 106.47 (quart. Ar-C), 101.44 (+, Ar-CH), 70.83 (-, OCH<sub>2</sub>), 50.23 (-, NCH<sub>2</sub>C), 47.58 (-, NCH<sub>2</sub>CH), 36.82 (+, Ar-CH), 30.95 (+, NCH<sub>2</sub>CH), 27.89 (+, NCH<sub>3</sub>). [α]<sub>589</sub><sup>20</sup> - 27,4 (c 0,1; MeOH). HRMS (C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>, ESI-MS) *m/z*: ber.: 362,1499 [MH<sup>+</sup>], gef.: 362,1498 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 99,5 %, *t*<sub>R</sub> = 18,2 min.

***tert*-Butyl 4-(((6*S*)-8-(benzyloxy)-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoate (*S*-22b)**

**C<sub>33</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (M = 551,24 g/mol)**

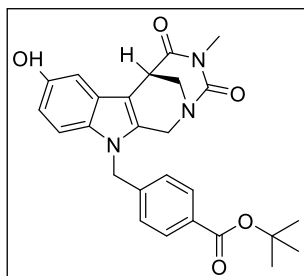


Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an **AV 5b** ausgehend von einer Mischung bestehend aus 8-(Benzyloxy)-4-methyl-6,11-dihydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-3,5(1*H*,4*H*)-dion (**S-20b**) (0,127 g, 0,35 mmol), *tert*-Butyl 4-(bromomethyl)benzoat (**21**) (0,103 g, 0,38 mmol) und K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,243 g, 1,76 mmol) in 2-Butanon (5,20 mL), welche für 16 Std bei 80 °C erhitzt wurde. Daraufhin lässt man den Reaktionsansatz auf Raumtemperatur

abkühlen, der Feststoff (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) wird abfiltriert, das LM unter reduziertem Druck entfernt und der Ansatz auf Kieselgel gezogen. SC (DCM / Ethylacetat (3:1)) ergab ein gelbes Öl (0,16 g, 0,29 mmol; 83 %). IR (ATR): 1710; 1685 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.99 (dd, *J* = 8.5, 2.3 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.51 – 7.46 (m, 2H), 7.43 – 7.32 (m, 4H), 7.12 – 7.10 (m, 3H), 6.91 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 5.30 (d, *J* = 17.0 Hz, 1H), 5.21 – 5.12 (m, 1H), 5.11 (d, *J* = 2.7 Hz, 2H), 4.85 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 4.26 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 3.90 (d, *J* = 13.0 Hz, 2H), 3.40 – 3.27 (m, 1H), 3.07 (s, 3H), 1.57 (s, 9H). [α]<sub>589</sub><sup>20</sup> - 24,0 (c 0,1; MeOH). HRMS (C<sub>33</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>, ESI-MS) *m/z*: ber.: 574,2312 [MNa<sup>+</sup>], gef.: 574,2317 [MNa<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 99,0 %, *t*<sub>R</sub> = 7,0 min.

***tert*-Butyl 4-(((6*S*)-8-hydroxy-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoate (*S*-22d)**

**C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (M = 461,20 g/mol)**



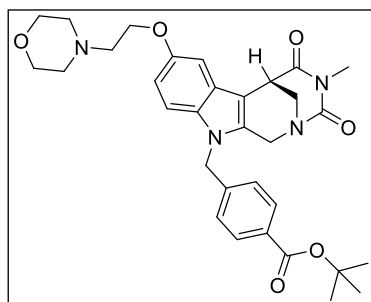
Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an die Lit.<sup>319</sup> ausgehend von *tert*-Butyl 4-((8-(benzyloxy)-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl) benzoat (**S-22b**) (0,155 g, 0,28 mmol) gelöst in einer Mischung aus THF / MeOH (2:1). Nach Zugabe von Pd / C 10 % (0,049 g) und

Ammoniumformiat (0,29 g, 4,6 mmol) wird das Reaktionsgemisch für 20 min bei 75 °C refluxiert und der Reaktionsfortschritt mittels DC-Kontrolle (DCM / Ethylacetat (3:1)) überwacht. Nach Reaktionsende wird das Pd / C über Celite abfiltriert, das LM unter reduziertem Druck entfernt und der Ansatz auf Kieselgel gezogen. SC (DCM / Ethylacetat

(3:1)) ergab einen Feststoff (0,100 g, 0,22 mmol; 79 %). Smp.: 206,3 °C. IR (KBr): 3416; 1715; 1663 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.86 (s, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.14 (m, 3H), 6.85 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.57 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 5.33 (s, 2H), 4.76 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 4.48 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 3.85 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 3.74 (br s, 1H), 3.40 (dd, *J* = 13.2, 2.2 Hz, 1H), 2.88 (s, 3H), 1.50 (s, 9H). [α]<sub>589</sub><sup>20</sup> - 89,5 (c 0,1; MeOH). HRMS (C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>, ESI-MS) *m/z*: ber.: 484,1843 [MNa<sup>+</sup>], gef.: 484,1841 [MNa<sup>+</sup>]. Anal. (C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>) ber.: C 67,66; H 5,90; N 9,10; gef.: C 67,48; H 6,06; N 8,88.

***tert*-Butyl 4-(((6*S*)-4-methyl-8-(2-morpholinoethoxy)-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoate (*S*-**22h**)**

C<sub>32</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (M = 574,28 g/mol)



Eine Mischung bestehend aus **S-22d** (0,082 g, 0,18 mmol), 4-(2-Chloroethyl)morpholin hydrochlorid (**30**) (0,044 g, 0,24 mmol) und K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,123 g, 0,89 mmol) in 2-Butanon (8,8 mL) wurde für 1 Tag refluxiert. Die weitere Aufarbeitung folgte der bereits für **22h** beschriebenen Arbeitsvorschrift. SC (1. DCM / Ethylacetat (3:1); 2. DCM / MeOH (10:1)

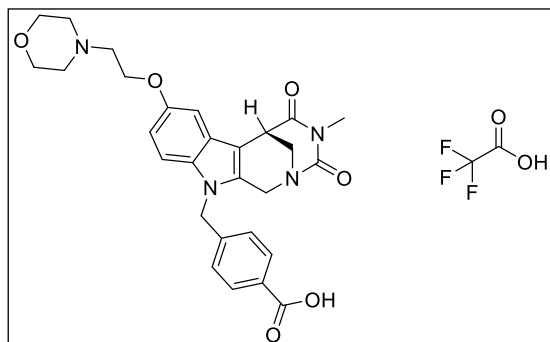
„dryload“-Methode) ergab ein gelbes Öl (0,067 g, 0,12 mmol; 67 %). IR (ATR): 1712; 1688 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.91 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.15 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.09 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.03 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 6.83 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 5.33 – 5.24 (m, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>Ar), 5.09 (d, *J* = 17.0 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>Ar), 4.84 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.29 – 4.21 (m, 3H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.89 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.85 (br s, 1H, NCH<sub>2</sub>CH), 3.82 (s, *J* = 32.6 Hz, 4H, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N - Morpholin), 3.32 (dd, *J* = 13.1, 2.2 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.06 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.95 – 2.84 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.75 (s, 4H, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N - Morpholin), 1.56 (s, 9H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 173.13 (quart. CO), 165.17 (quart. CO), 161.26 (quart. CO), 152.68 (quart. O-Ar-C), 141.02 (quart. Ar-C), 133.80 (quart. Ar-C), 131.90 (quart. Ar-C), 131.77 (quart. Ar-C), 130.20 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 126.49 (quart. Ar-C), 126.07 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 113.22 (+, Ar-CH), 110.44 (+, Ar-CH), 105.97 (quart. Ar-C), 101.48 (+, Ar-CH), 81.27 (quart. OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 72.83 (-, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N - Morpholin), 65.46 (-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 57.68 (-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 53.91 (-, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N - Morpholin), 49.46 (-, NCH<sub>2</sub>C), 47.37 (-, NCH<sub>2</sub>CH),

47.12 (-, NCH<sub>2</sub>Ar), 36.87 (+, NCH<sub>2</sub>C<sub>H</sub>), 28.36 (+, OC(C<sub>H</sub><sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.91 (+, NCH<sub>3</sub>).  
 $[\alpha]^{20}_{589} + 42,1$  (c 0,1; MeOH). HRMS (C<sub>32</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>, ESI-MS)  $m/z$ : ber.: 575,2864 [MH<sup>+</sup>], gef.: 575,2874 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 99,7 %,  $t_R$  = 11,4 min.

**4-(2-(((6*S*)-11-(4-carboxybenzyl)-4-methyl-3,5-dioxo-1,3,4,5,6,11-hexahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-8-yl)oxy)ethyl)morpholin-4-ium 2,2,2-trifluoroacetat (S-23h)**

**C<sub>30</sub>H<sub>31</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> (M = 632,21 g/mol)**



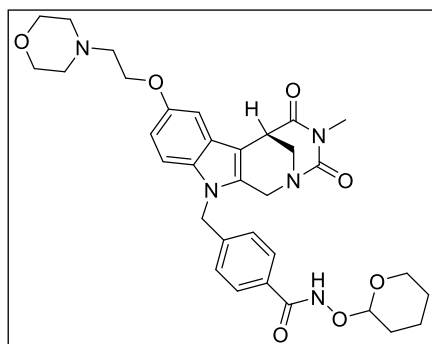
Ausgehend von *tert*-Butyl 4-((4-methyl-8-(2-morpholinoethoxy)-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoat (**S-22h**) (0,161 g, 0,28 mmol) wurde zunächst eine Lösung in DCM (4,90 mL) hergestellt, zu der dann CF<sub>3</sub>COOH (1,97 mL) hinzutropft und diese dann für 20 min bei

Raumtemperatur gerührt wurde (DC-Kontrolle). Das LM wurde im Ölpumpenvakuum abgezogen und der Rückstand als TFA-Salz gewonnen. Man erhält ein braunes Öl (0,237 g, 0,37 mmol; 99 %). IR (ATR): 1671; 1167 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.99 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.36 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.10 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.85 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 5.42 (s, 2H), 4.82 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 4.54 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 4.38 – 4.27 (m, 4H), 4.04 – 3.94 (m, 3H), 3.91 (d, *J* = 12.8 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.47 – 3.42 (m, 4H), 2.90 (s, 3H). <sup>19</sup>F NMR (377 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ -73.70 (s).  $[\alpha]^{20}_{589} + 10,7$  (c 0,1; MeOH). HRMS (C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>, ESI-MS)  $m/z$ : ber.: 519,2238 [MH<sup>+</sup>], gef.: 519,2238 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode B): 100,0 %,  $t_R$  = 10,5 min.



**4-(((6*S*)-4-Methyl-8-(2-morpholinoethoxy)-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (*S*-26h)**

**C<sub>33</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (M = 617,29 g/mol)**



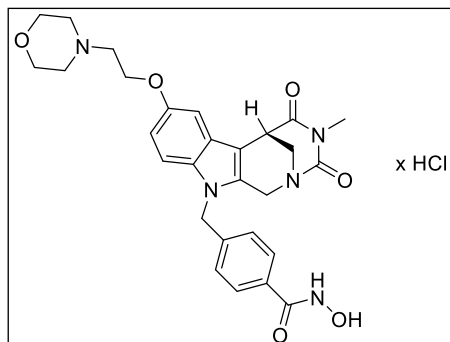
Die Darstellung erfolgte ausgehend von 4-((4-Methyl-8-(2-morpholinoethoxy)-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoesäure (*S*-23h) (0,237 g, 0,46 mmol) laut der für **R-26a** beschriebenen Arbeitsvorschrift. Der Reaktionsansatz wurde für 1,5 Std bei Raumtemperatur gerührt. Extraktion (H<sub>2</sub>O / Ethylacetat)

und SC (DCM/ MeOH (10:1) ergaben ein gelbes Öl (0,131 g, 0,21 mmol; 46 %). IR (ATR): 1728; 1638 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.57 (s, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.00 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.74 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 5.36 (s, 2H), 5.11 – 5.07 (m, 1H), 4.98 – 4.93 (m, 1H), 4.81 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 4.52 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 4.11 – 4.06 (m, 2H), 3.88 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 3.82 (br s, 1H), 3.60 – 3.57 (m, 4H), 3.56 – 3.52 (m, 2H), 2.88 (s, 3H), 2.77 – 2.71 (m, 2H), 2.43 – 2.37 (m, 2H), 2.32 – 2.27 (m, 1H), 1.70 – 1.55 (m, 6H).

**HPLC** (Phenomenex Lux Cellulose-2, MeOH 90 %, 10 % <sup>i</sup>Prop., 1,0 mL / min, 10 µL, 215 nm): *t<sub>R</sub>* = 21,4 - 26,8 min *S*-Enantiomer, *t<sub>R</sub>* = 38,7 - 43,6 min *R*-Enantiomer; 94 % ee, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup><sub>589</sub> + 32,0 (c 0,1; MeOH). HRMS (C<sub>33</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, ESI-MS) *m/z*: ber.: 618,2922 [MH<sup>+</sup>], gef.: 618,2928 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode B): 97,7 %, *t<sub>R</sub>* = 11,2 min.

***N*-Hydroxy-4-(((6*S*)-4-methyl-8-(2-morpholinoethoxy)-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzamid hydrochlorid (*S*-13h)**

**C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>6</sub> (M = 569,20 g/mol)**



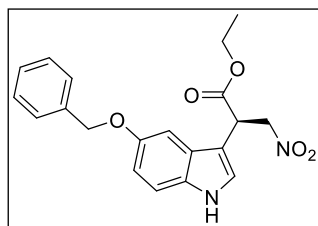
Die Synthese erfolgte ausgehend von 4-((4-Methyl-8-(2-morpholinoethoxy)-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (*S*-23h) (0,060 g, 0,10 mmol). **S-23h** wird in DCM (2,09 mL) gelöst, mit 6 N HCl(<sub>iprop</sub>) (0,08 mL) angesäuert (pH = 1)

und für 2 Std bei Raumtemperatur gerührt (DC-Kontrolle: DCM / MeOH (10:1)). Das LM wird abdekantiert, der Rückstand mit DCM gewaschen. Der verbleibende gelbliche Feststoff wird in einer geringen Menge MeOH (1,0 mL) gelöst. Diese Lösung wird dann in eine Mischung aus Petrolether / Ethylacetat (1:1, 30 mL) eingetropft. Im Anschluss wird das Produkt abfiltriert und der Rückstand getrocknet. Man erhält einen weißen bis leicht gelblichen Feststoff (0,048 g, 0,08 mmol; 80 %). Smp.: 175,7 °C. IR (KBr): 3416; 1671; 1614 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.18 (s, 1H, NHOH), 9.01 (s, 1H, NHOH), 7.65 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.33 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.09 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.05 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.82 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 5.36 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.82 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.55 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.45 – 4.33 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.95 – 3.80 (m, 6H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N - Morpholin, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N - Morpholin, NCH<sub>2</sub>CH), 3.55 – 3.42 (m, 5H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N - Morpholin, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.20 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N - Morpholin), 2.89 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 173.58 (quart. CO), 164.26 (quart. CO), 161.31 (quart. CO), 152.68 (quart. O-Ar-C), 141.20 (quart. Ar-C), 135.49 (quart. Ar-C), 132.37 (quart. Ar-C), 131.99 (quart. Ar-C), 127.72 (-, Ar-CH<sub>2</sub>), 127.02 (-, (Ar-CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 126.61 (quart. Ar-C), 112.22 (-, Ar-CH), 111.75 (-, Ar-CH), 105.50 (quart. Ar-C), 102.20 (-, Ar-CH), 63.63 (+, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N - Morpholin), 63.38 (+, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 55.58 (+, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 52.14 (+, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N - Morpholin), 49.44 (+, NCH<sub>2</sub>C), 46.69 (+, NCH<sub>2</sub>CH), 46.56 (+, NCH<sub>2</sub>Ar), 36.49 (-, NCH<sub>2</sub>CH), 27.88 (-, NCH<sub>3</sub>). Bei der Aufnahme des Dept 135-Spektrums erschienen bei dieser Verbindung, die CH<sub>2</sub>-Gruppen im „positivem“ Bereich und die CH- bzw. CH<sub>3</sub>- Gruppen im „negativem“. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup><sub>589</sub> + 14,3 (c 0,1; H<sub>2</sub>O). HRMS (C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>, ESI-MS) *m/z*: ber.: 534,2347 [MH<sup>+</sup>], gef.: 534,2350 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode B): 96,0 %, t<sub>R</sub> = 8,5 min.

### Ethyl (*R*)-2-(5-(benzyloxy)-1*H*-indol-3-yl)-3-nitropropanoat (*R*-108)

C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (M = 368,14 g/mol)



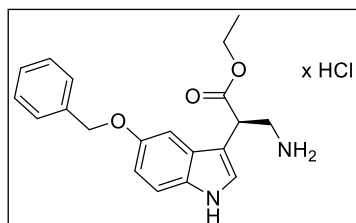
Die Synthese erfolgte, wie für das *R*-Enantiomer **R-102** beschrieben, ausgehend von 5-(Benzyloxy)-1*H*-indol (**14b**) (2,90 g, 12,99 mmol), welches käuflich erworben wurde. SC (DCM / n-Hexan / Ethylacetat (1:5:1)) ergab ein braunes Öl (3,30 g, 8,96 mmol; 69 %). IR (ATR): 1726; 1552 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.14 (s, 1H),

7.52 – 7.47 (m, 2H), 7.44 – 7.27 (m, 4H), 7.17 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 7.11 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 6.98 (dd,  $J = 8.8, 2.4$  Hz, 1H), 5.21 – 5.15 (m, 1H), 5.12 (s, 2H), 4.67 (dd,  $J = 9.7, 4.9$  Hz, 1H), 4.59 (dd,  $J = 14.1, 4.9$  Hz, 1H), 4.31 – 4.06 (m, 2H), 1.23 (t,  $J = 9.8, 4.5$  Hz, 3H).

**HPLC** (Chiracel OD-H, Hexan 90 %, 10 %  $i$ Prop., 0,6 mL / min, 5  $\mu$ L 220 nm):  $t_R = 145,6$  min *R*-Enantiomer,  $t_R = 139,2$  min *S*-Enantiomer;  $\geq 99$  % ee.  $[\alpha]^{20}_{589} + 89,5$  (c 0,1; MeOH). HRMS ( $C_{20}H_{20}N_2O_5$ , ESI-MS)  $m/z$ : ber.: 369,1445  $[MH^+]$ , gef.: 369,1445  $[MH^+]$ . RP-HPLC (220 nm, Methode A): 100,0 %,  $t_R = 21,7$  min.

### Ethyl (*R*)-3-amino-2-(5-(benzyloxy)-1*H*-indol-3-yl)propanoat hydrochlorid (**R-109**)

$C_{20}H_{23}ClN_2O_3$  (M = 374,14 g/mol)

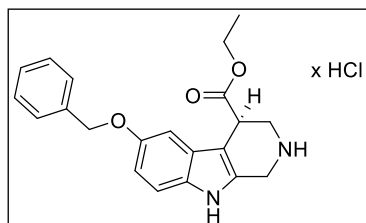


Die Synthese erfolgte, wie für das *R*-Enantiomer **R-103** beschrieben, ausgehend von (*R*)-Ethyl 2-(1*H*-indol-3-yl)-3-nitropropanoat (**R-108**) (4,71 g, 12,79 mmol). SC (DCM/MeOH (5:1)+1 %  $NH_3$ ) und ansäuern (5-6 N HCl ( $i$ prop)) ergaben einen

Feststoff (3,66 g, 9,76 mmol; 76 %). Smp.: 46,7 °C. IR (KBr): 3414; 2906; 1720; 1484  $cm^{-1}$ .  $^1H$ -NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  11.10 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 8.12 (s, 2H), 7.52 – 7.29 (m, 6H), 7.26 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.22 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 6.86 (dd,  $J = 8.8, 2.4$  Hz, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.29 – 4.21 (m, 1H), 4.09 (q,  $J = 10.8, 7.1$  Hz, 2H), 3.60 (dd,  $J = 8.7, 4.6$  Hz, 1H), 3.19 – 3.07 (m, 1H), 1.13 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H).  $[\alpha]^{20}_{589} + 77,5$  (c 0,1; MeOH). HRMS ( $C_{20}H_{22}N_2O_3$ , ESI-MS)  $m/z$ : ber.: 361,1523  $[MNa^+]$ , gef.: 361,1519  $[MNa^+]$ . RP-HPLC (220 nm, Methode A): 100,0 %,  $t_R = 21,7$  min.

### Ethyl (*R*)-6-(benzyloxy)-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat hydrochlorid (**R-110**)

$C_{21}H_{23}ClN_2O_3$  (M = 386,14 g/mol)



Die Synthese erfolgte ausgehend von Ethyl (*R*)-3-amino-2-(5-(benzyloxy)-1*H*-indol-3-yl)propanoat hydrochlorid (**R-109**) (3,06 g, 8,16 mmol), der Arbeitsvorschrift **AV2** folgend, wobei der Reaktionsansatz nicht auf 60 °C erhitzt wurde. Das Produkt

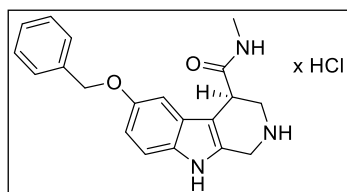
präzipitierte über Nacht bei Raumtemperatur als Feststoff. Das Versetzen der Mutterlauge mit Ether führte zu einer Erhöhung der Ausbeute. Gesamtausbeute (2,20 g, 5,69 mmol; 70 %). Smp.: 266,4 - 267,0 °C. IR (KBr): 2921; 2793; 1719  $cm^{-1}$ .  $^1H$ -NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$

11.20 (s, 1H), 10.20 (s, 1H), 9.12 (s,  $J = 430.8$  Hz, 1H), 7.47 – 7.26 (m, 6H), 7.12 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 6.85 (dd,  $J = 8.8, 2.4$  Hz, 1H), 5.07 (q,  $J = 12.1$  Hz, 2H), 4.38 – 4.21 (m, 2H), 4.19 – 4.15 (m, 1H), 4.15 – 4.03 (m, 2H), 3.58 (m, 2H), 1.20 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H).

**HPLC** (Chiracel OD-H, Hexan 90 %, 10 %  $i$ Prop., 0,6 mL / min, 5  $\mu$ L 220 nm):  $t_R = 107,9$  min *R*-Enantiomer,  $t_R = 87,4$  min *S*-Enantiomer;  $\geq 99$  % ee.  $[\alpha]_{589}^{20} + 128,8$  (c 0,1; MeOH). HRMS ( $C_{21}H_{22}N_2O_3$ , ESI-MS)  $m/z$ : ber.: 351,1703  $[MH^+]$ , gef.: 351,1704  $[MH^+]$ . RP-HPLC (220 nm, Methode A): 99,7 %,  $t_R = 8,0$  min.

**(*R*)-6-(Benzyloxy)-*N*-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxamid hydrochlorid (*R*-111)**

$C_{20}H_{22}ClN_3O_2$  (M = 371,14 g/mol)

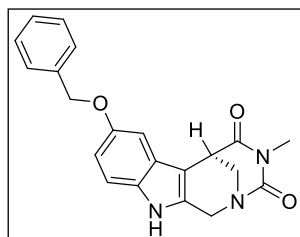


Die Darstellung erfolgte, wie für das *S*-Enantiomer **S-111** beschrieben, ausgehend von Ethyl (*R*)-6-(benzyloxy)-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxylat hydrochlorid (**R-110**) (0,40 g, 1,03 mmol). SC ( $SiO_2$ ; DCM / MeOH /  $NH_3$ <sub>conc.</sub> 5:1:1 %) („dryload“-Methode) ergab einen Feststoff (0,135 g, 0,36 mmol; 35 %).

Smp.: 156,7 °C. IR (KBr): 2933; 1643  $cm^{-1}$ .  $^1H$ -NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10.65 (s, 1H), 7.94 – 7.88 (m, 1H), 7.46 – 7.27 (m, 5H), 7.16 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.00 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 6.73 (dd,  $J = 8.7, 2.4$  Hz, 1H), 5.03 (d,  $J = 4.2$  Hz, 2H), 3.91 – 3.78 (m, 2H), 3.49 – 3.42 (m, 1H), 3.13 (dd,  $J = 12.9, 4.1$  Hz, 1H), 2.96 (dd,  $J = 12.9, 4.8$  Hz, 1H), 2.57 (d,  $J = 4.6$  Hz, 3H).  $[\alpha]_{589}^{20} + 36,9$  (c 0,1; MeOH). HRMS ( $C_{20}H_{21}N_3O_2$ , ESI-MS)  $m/z$ : ber.: 336,1707  $[MH^+]$ , gef.: 336,1706  $[MH^+]$ . RP-HPLC (220 nm, Methode A): 99,2 %,  $t_R = 6,2$  min.

**(6*R*)-8-(Benzyloxy)-4-methyl-6,11-dihydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-3,5(1*H*,4*H*)-dion (*R*-20b)**

$C_{21}H_{19}N_3O_3$  (M = 361,14 g/mol)



Die Synthese der Kopfgruppe erfolgte, wie für das *S*-Enantiomer **S-20b** beschrieben, ausgehend von (*R*)-6-(Benzyloxy)-*N*-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-4-carboxamid hydrochlorid (**R-111**) (0,136 g, 0,37 mmol). SC (Ethylacetat, „dryload“-Methode) ergab einen beigen Feststoff (0,094 g, 0,26 mmol; 70 %).

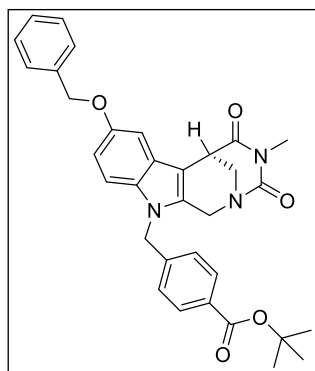
Smp.: 236,1 - 236,4 °C. IR (KBr): 2926; 1729; 1672  $cm^{-1}$ .  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$

8.03 (s, 1H, NH (Indol)), 7.51 – 7.47 (m, 2H, Ar-H), 7.42 – 7.29 (m, 3H, Ar-H), 7.23 – 7.19 (m, 2H, Ar-H), 6.92 (dd,  $J = 8.8, 2.4$  Hz, 1H, Ar-H), 5.14 – 5.05 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar (Benzyl)), 4.87 (d,  $J = 16.3$  Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.50 (d,  $J = 16.3$  Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 3.90 (d,  $J = 13.1$  Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.83 (s, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.37 (dd,  $J = 13.1, 2.2$  Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.07 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  173.25 (quart. CO), 160.96 (quart. CO), 154.05 (quart. Ar-C), 137.42 (quart. Ar-C), 132.49 (quart. Ar-C), 130.92 (quart. Ar-C), 128.55 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 127.87 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 127.71 (+, Ar-CH), 126.62 (quart. Ar-C), 113.65 (+, Ar-CH), 112.06 (+, Ar-CH), 106.49 (quart. Ar-C), 101.46 (+, Ar-CH), 70.85 (-, NCH<sub>2</sub>Ar (Benzyl)), 50.25 (-, NCH<sub>2</sub>C), 47.60 (-, NCH<sub>2</sub>CH), 36.84 (+, NCH<sub>2</sub>CH), 27.91 (+, NCH<sub>3</sub>).  $[\alpha]_{589}^{20} + 30,4$  (c 0,1; MeOH). HRMS ( $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$ , ESI-MS)  $m/z$ : ber.: 362,1499  $[\text{MH}^+]$ , gef.: 362,1500  $[\text{MH}^+]$ . RP-HPLC (220 nm, Methode A): 99,5 %,  $t_R = 18,2$  min.

***tert*-Butyl 4-(((6*R*)-8-(benzyloxy)-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoate (*R*-22b)**

$\text{C}_{33}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_5$  ( $M = 551,24$  g/mol)

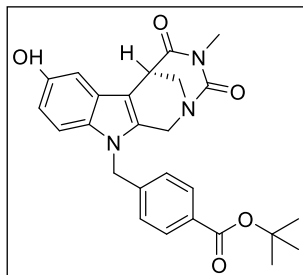


Die Darstellung erfolgte ausgehend von (6*R*)-8-(Benzyloxy)-4-methyl-6,11-dihydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-3,5(1*H*,4*H*)-dion (*R*-20b) (0,071 g, 0,20 mmol) analog zu der für *S*-22b beschriebenen Arbeitsvorschrift. SC (DCM / Ethylacetat (3:1)) ergab ein gelbes Öl (0,128 g, 0,23 mmol; 87 %). IR (KBr): 1710; 1684  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  7.88 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 7.80 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.46 (d,  $J = 7.6$  Hz, 3H), 7.37 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.30 – 7.28 (m, 1H), 7.13 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.09 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 6.82 (dd,  $J = 8.9, 2.4$  Hz, 1H), 5.39 (s, 2H), 5.11 – 5.03 (m, 2H), 4.79 (d,  $J = 16.6$  Hz, 1H), 4.50 (d,  $J = 16.5$  Hz, 1H), 3.87 (d,  $J = 12.8$  Hz, 1H), 3.81 (br s, 1H), 3.42 (dd,  $J = 13.1, 2.0$  Hz, 1H), 2.89 (s, 3H), 1.50 (s, 9H).  $[\alpha]_{589}^{20} + 25,0$  (c 0,1; MeOH). HRMS ( $\text{C}_{33}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_5$ , ESI-MS)  $m/z$ :

ber.: 552,2493  $[\text{MH}^+]$ , gef.: 552,2491  $[\text{MH}^+]$ . RP-HPLC (220 nm, Methode A): 98,7 %,  $t_R = 7,0$  min.

***tert*-Butyl 4-(((6*R*)-8-hydroxy-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoat (*R*-22d)**

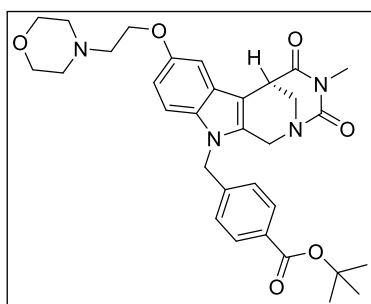
**C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (M = 461,20 g/mol)**



Die Darstellung erfolgte, wie für das *S*-Enantiomer **S-22d** beschrieben, ausgehend von *tert*-Butyl 4-(((6*R*)-8-(benzyloxy)-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoat (**R-22b**) (0,138 g, 0,25 mmol). SC (DCM / Ethylacetat (3:1)) ergab einen Feststoff (0,068 g, 0,15 mmol; 60 %). Smp.: 105,9 °C. IR (KBr): 2927; 1713; 1665 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.86 (s, 1H), 7.80 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.21 – 7.10 (m, 3H), 6.85 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.57 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 5.35 (d, *J* = 14.8 Hz, 2H), 4.76 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 4.48 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 3.85 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H), 3.75 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 3.46 – 3.34 (m, 1H), 2.88 (s, 3H), 1.50 (s, 9H). [α]<sub>D</sub><sup>20</sup><sub>589</sub> - 96,8 (c 0,1; MeOH). MS (C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>, LC-MS, ESI) *m/z* (%): 462 [MH<sup>+</sup>] (26), 406 [MH<sup>+</sup>-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>] (100), 479 [MNH<sub>4</sub><sup>+</sup>] (83). Anal. (C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>) ber.: C 67,66; H 5,90; N 9,10; gef.: C 67,26; H 6,04; N 8,74.

***tert*-Butyl 4-(((6*R*)-4-methyl-8-(2-morpholinoethoxy)-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoate (*R*-22h)**

**C<sub>32</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (M = 574,28 g/mol)**



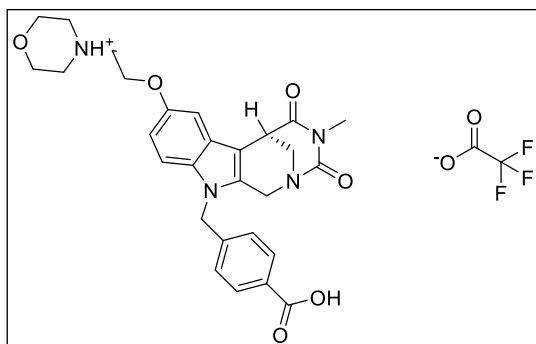
Die Darstellung erfolgte, wie für das *S*-Enantiomer **S-22h** beschrieben, ausgehend von *tert*-Butyl 4-(((6*R*)-8-hydroxy-4-methyl-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzoat (**R-22d**) (0,157 g, 0,34 mmol). SC (1. DCM / Ethylacetat (3:1); 2. DCM / MeOH (10:1) „dryload“-Methode) ergab ein gelbes Öl (0,161 g, 0,28 mmol; 82 %). Smp.: 66,1 °C. IR (KBr): 2927; 1712; 1688 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.91 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.15 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.09 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.03 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 6.83 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 5.33 – 5.24 (m, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>Ar), 5.09 (d, *J* = 17.0 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>Ar), 4.84 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.32 – 4.17 (m, 3H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.89 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.85 (br s, 1H, NCH<sub>2</sub>CH), 3.85 – 3.77 (m, 4H, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N - Morpholin),

3.32 (dd,  $J = 13.1, 2.2$  Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.06 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.95 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.75 (br s, 4H, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N - Morpholin), 1.56 (s, 9H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  173.12 (quart. CO), 165.16 (quart. CO), 161.25 (quart. CO), 153.65 (quart. O-Ar-C), 141.01 (quart. Ar-C), 133.83 (quart. Ar-C), 131.93 (quart. Ar-C), 131.79 (quart. Ar-C), 130.20 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 126.49 (quart. Ar-C), 126.07 (+, (Ar-CH)<sub>2</sub>), 113.15 (+, Ar-CH), 110.46 (+, Ar-CH), 105.98 (quart. Ar-C), 101.53 (+, Ar-CH), 81.27 (quart. OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 66.42 (-, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N - Morpholin), 65.87 (-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 57.61 (-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 53.83 (-, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N - Morpholin), 49.46 (-, NCH<sub>2</sub>C), 47.36 (-, NCH<sub>2</sub>CH), 47.13 (-, NCH<sub>2</sub>Ar), 36.86 (+, NCH<sub>2</sub>CH), 28.16 (+, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.91 (+, NCH<sub>3</sub>).  $[\alpha]^{20}_{589} - 46,8$  (c 0,1; MeOH). HRMS (C<sub>32</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>, ESI-MS)  $m/z$ : ber.: 575,2864 [MH<sup>+</sup>], gef.: 575,2866 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode A): 98,5 %,  $t_R = 11,4$  min.

**4-(2-(((6*R*)-11-(4-Carboxybenzyl)-4-methyl-3,5-dioxo-1,3,4,5,6,11-hexahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-8-yl)oxy)ethyl)morpholin-4-ium 2,2,2-trifluoroacetat (*R*-23h)**

**C<sub>30</sub>H<sub>31</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> (M = 632,21 g/mol)**



Die Synthese der Carbonsäure erfolgte, wie für das *S*-Enantiomer **S-23h** beschrieben, ausgehend von

*tert*-Butyl 4-(((6*R*)-4-methyl-8-(2-morpholinoethoxy)-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)

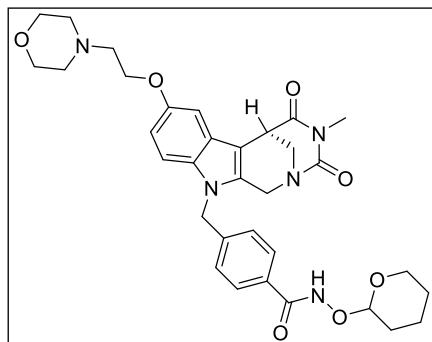
benzoat (**R-22h**) (0,033 g, 0,06 mmol). Man

erhielt ein braunes Öl (0,05 g, 0,08 mmol; 99 %). IR (ATR): 2925; 1723; 1684 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  9.93 (s, 1H), 7.84 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.34 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.13 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.10 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 6.83 (dd,  $J = 8.9, 2.4$  Hz, 1H), 5.41 (s, 2H), 4.81 (d,  $J = 16.6$  Hz, 1H), 4.53 (d,  $J = 16.6$  Hz, 1H), 4.38 – 4.27 (m, 4H), 4.00 – 3.96 (m, 3H), 3.89 (d,  $J = 12.6$  Hz, 2H), 3.82 (s, 2H), 3.47 – 3.42 (m, 4H), 2.88 (s, 3H). <sup>19</sup>F-NMR (377 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  -73.70 (s).  $[\alpha]^{20}_{589} - 11,7$  (c 0,1; MeOH). HRMS (C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>, ESI-MS)  $m/z$ : ber.: 519,2238 [MH<sup>+</sup>], gef.: 519,2244 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode B): 100,0 %,  $t_R = 10,5$  min.

und 4.38 – 4.27 (m, 4H) und 3.47 – 3.42 (m, 4H)

**4-(((6*R*)-4-Methyl-8-(2-morpholinoethoxy)-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (*R*-26h)**

**C<sub>33</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (M = 617,29 g/mol)**



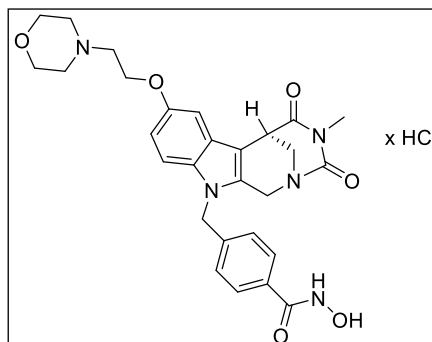
Die Darstellung erfolgte, wie für das *S*-Enantiomer **S-26h** beschrieben, ausgehend von 4-(2-(((6*R*)-11-(4-Carboxybenzyl)-4-methyl-3,5-dioxo-1,3,4,5,6,11-hexahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-8-yl)oxy)ethyl)morpholin-4-ium 2,2,2-trifluoroacetat (**R-23h**) (0,063 g, 0,10 mmol). Extraktion (H<sub>2</sub>O / Ethylacetat) und SC (DCM / MeOH (10:1) ergaben ein gelbes Öl (0,042 g,

0,07 mmol; 70 %). IR (ATR): 1727; 1683 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.56 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.28 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.05 – 6.99 (m, 1H), 6.76 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 5.36 (s, 2H), 5.11 – 5.07 (m, 1H), 4.98 – 4.93 (m, 1H), 4.80 (d, *J* = 16.7 Hz, 1H), 4.51 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 4.11 – 4.06 (m, 2H), 3.87 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H), 3.81 (br s, 1H), 3.63 – 3.56 (m, 4H), 3.56 – 3.52 (m, 2H), 2.87 (s, 3H), 2.77 – 2.66 (m, 2H), 2.43 – 2.37 (m, 2H), 2.32 – 2.27 (m, 1H), 1.67 – 1.51 (m, 6H).

**HPLC** (Phenomenex Lux Cellulose-2, MeOH 90 %, 10 % <sup>i</sup>Prop., 1,0 mL / min, 10 µL, 215 nm): *t<sub>R</sub>* = 33,8 – 37 min *R*-Enantiomer, *t<sub>R</sub>* = 18,7 – 23,4 min *S*-Enantiomer; 94 % ee, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup><sub>589</sub> - 32,3 (c 0,1; MeOH). HRMS (C<sub>33</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, ESI-MS) *m/z*: ber.: 618,2922 [MH<sup>+</sup>], gef.: 618,2932 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode B): 97,8 %, *t<sub>R</sub>* = 11,4 min.

***N*-Hydroxy-4-(((6*R*)-4-methyl-8-(2-morpholinoethoxy)-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)benzamid hydrochlorid (*R*-13h)**

**C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>6</sub> (M = 569,20 g/mol)**



Die Darstellung erfolgte, wie für das *S*-Enantiomer **S-13h** beschrieben, ausgehend von 4-(((6*R*)-4-Methyl-8-(2-morpholinoethoxy)-3,5-dioxo-3,4,5,6-tetrahydro-2,6-methano[1,3]diazocino[5,6-*b*]indol-11(1*H*)-yl)methyl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzamid (**R-26h**) (0,044 g, 0,07 mmol). Man erhält einen Feststoff (0,029 g,



0,05 mmol; 71 %). Smp.: 280,8 °C. IR (KBr): 3415; 1724; 1679 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.18 (s, 1H, NHOH), 9.00 (s, 1H, NHOH), 7.65 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.33 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.09 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.05 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.82 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 5.36 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.82 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.54 (dd, *J* = 16.2, 8.7 Hz, 1H, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C), 4.44 – 4.33 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.96 – 3.79 (m, 6H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N - Morpholin, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N - Morpholin, NCH<sub>2</sub>CH), 3.55 – 3.42 (m, 5H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N - Morpholin, NCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 3.20 (s, *J* = 16.3 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N - Morpholin), 2.89 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 173.58 (quart. CO), 164.16 (quart. CO), 161.31 (quart. CO), 152.68 (quart. O-Ar-C), 141.27 (quart. Ar-C), 135.62 (quart. Ar-C), 132.33 (quart. Ar-C), 131.99 (quart. Ar-C), 127.71 (-, Ar-CH<sub>2</sub>), 127.02 (-, Ar-CH<sub>2</sub>), 126.61 (quart. Ar-C), 112.22 (-, Ar-CH), 111.75 (-, Ar-CH), 105.50 (quart. Ar-C), 102.12 (-, Ar-CH), 63.63 (+, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N - Morpholin), 63.32 (+, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 55.59 (+, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 52.14 (+, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N - Morpholin), 49.44 (+, NCH<sub>2</sub>C), 46.67(+, NCH<sub>2</sub>CH), 46.57(+, NCH<sub>2</sub>Ar), 36.41 (-, NCH<sub>2</sub>CH), 27.88 (-, NCH<sub>3</sub>). Bei der Aufnahme des Dept 135-Spektrums erschienen bei dieser Verbindung, die CH<sub>2</sub>-Gruppen im „positivem“ Bereich und die CH- bzw. CH<sub>3</sub>-Gruppen im „negativem“. [ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>20</sup> - 14,0 (c 0,1; H<sub>2</sub>O). HRMS (C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>, ESI-MS) *m/z*: ber.: 534,2347 [MH<sup>+</sup>], gef.: 534,2354 [MH<sup>+</sup>]. RP-HPLC (220 nm, Methode B): 95,0 %, t<sub>R</sub> = 8,5 min.

## 9.5 Röntgenkristallographische Daten

Die im Folgenden dargestellten Daten wurden von der Abteilung für Röntgenstrukturanalyse der Universität Regensburg generiert und zur Verfügung gestellt.

### 9.5.1 R-104

Die kristallographischen Daten für diese Struktur sind unter der CCDC-Nummer 1532351 hinterlegt und können kostenlos unter der folgenden Internetadresse abgerufen werden:  
[www.ccdc.cam.ac.uk/structures](http://www.ccdc.cam.ac.uk/structures).

#### Kristall- und Strukturdaten für (R-104):

CCDC-Nr.	1532351
Summenformel	$\text{C}_{35.995}\text{H}_{37.99}\text{N}_2\text{O}_{11.995}$
Kalkulierte Dichte	$1,277 \text{ g/cm}^3$
Absorptionskoeffizient	$0,808 \text{ }\mu\text{m}^{-1}$
Molare Masse	690,53 g/mol
Temperatur	293(2) K
Kristallsystem	monoclinic
Flack Parameter	-0,08(5)
Hooft Parameter	-0,05(4)
Raumgruppe	C2
Gitterkonstanten	$a = 33,0094(4) \text{ }\text{\AA}$ ,
	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 7,65881(11) \text{ }\text{\AA}$ ,
	$= 91,1146(11)^\circ$
	$c = 14,20813(16) \text{ }\text{\AA}$ ,
	$\gamma = 90^\circ$
Volumen	$3591,31(8) \text{ }\text{\AA}^3$
Z	4
Z'	1
$\theta_{\min}^\circ$	4,067 [e- $\text{\AA}^{-3}$ ]
$\theta_{\max}^\circ$	73,534 [e- $\text{\AA}^{-3}$ ]
Reflexe (collected)	36890
Reflexe (unabhängig)	6807
Anzahl der benutzten Reflexe	6620
$R_{\text{int}}$	0,0338
Parameter	617
Einschränkungsbeefhle	458
Largest Peak	0,576
Deepest Hole	-0,311
Goodness -of-fit $F^2$	1,023
R Indices (alle Daten)	$R_1 = 0,0415$ , $wR_2 = 0,1113$
Finale R Indices [ $I > 2\sigma(I)$ ]	$R_1 = 0,0405$ , $wR_2 = 0,1102$

**Kohlenstoff-Atomkoordinaten [ $\text{\AA}^2 \times 10^4$ ] und äquivalente isotrope Temperaturfaktoren [ $\text{\AA}^2 \times 10^4$ ]**

Atom	x	y	z	$U_{eq}$
O4	5800.9(5)	3056(2)	5642.3(11)	22.2(3)
O3	5475.8(5)	1711(3)	4441.1(13)	27.1(4)
O9	5894.5(5)	3507(2)	7523.8(12)	26.8(4)
O5	5198.4(6)	325(3)	7109.2(13)	29.5(4)
O8	5782.0(6)	6780(3)	6913.3(13)	29.0(4)
O6	5765.6(5)	-166(2)	6308.0(13)	28.1(4)
O10	5659.3(7)	4494(3)	8896.6(14)	43.0(5)
O11	6586.3(6)	6845(4)	6450.8(15)	43.3(5)
O7	5166.5(6)	6196(3)	6305.6(18)	43.8(5)
N2	3506.3(7)	8198(4)	5458.6(16)	32.3(5)
N1	4539.8(6)	8385(3)	6503.9(15)	26.7(4)
C22	5767.4(7)	2517(3)	4748.5(17)	22.4(5)
O2	3560(2)	7667(10)	8775(5)	39.0(7)
O1	4076(2)	9178(13)	9371(6)	39.0(6)
C18	6118.5(7)	3080(3)	4191.2(17)	23.9(5)
C4	3835.2(7)	8211(4)	6065.7(17)	25.4(5)
C19	6060.8(7)	3405(4)	3232.2(17)	25.3(5)
C24	5468.7(7)	797(3)	6594.9(17)	23.9(5)
C26	5483.7(8)	5796(3)	6738.8(19)	27.2(5)
C3	4246.2(7)	7648(4)	5798.3(18)	26.9(5)
C10	3179.7(8)	8829(4)	5930(2)	36.4(6)
C20	6374.5(8)	4068(4)	2713.4(17)	28.4(5)
C5	3726.6(8)	8836(4)	6924.0(17)	25.9(5)
C2	4417.5(8)	8082(4)	7495.7(18)	30.6(6)
C27	5931.7(9)	3874(4)	8446.2(18)	30.4(5)
C15	6753.6(8)	4380(4)	3125.2(19)	30.0(6)
C25	5511.3(8)	3900(3)	7074.1(18)	26.4(5)
C16	6806.7(8)	4022(5)	4080(2)	39.7(7)
C17	6493.5(8)	3405(5)	4614.5(18)	34.5(6)
C23	5469.0(7)	2668(3)	6247.6(17)	23.5(5)
C9	3304.3(8)	9263(4)	6856(2)	30.6(6)
C28	6339.0(9)	3409(4)	8827.3(17)	36.5(5)
C14	3049(4)	9870(30)	7529(14)	37.3(11)
C1	4026.7(8)	9081(4)	7716.7(17)	28.9(5)
C6	3879.2(10)	8440(5)	8664.7(19)	38.6(5)
C29	6406.2(9)	3513(5)	9794.9(18)	41.1(5)
C21	7098.0(9)	5108(5)	2562(2)	38.2(7)
C31	7118(2)	2670(12)	9637(4)	40.5(6)
C13	2642(3)	10063(17)	7298(7)	38(1)
C33	6674.4(15)	3039(10)	8284(4)	37.7(6)
C11	2754(4)	8847(16)	5713(9)	39.0(11)
C30	6782.2(9)	3067(5)	10177(2)	42.7(5)
C32	7057.4(19)	2680(9)	8666(5)	39.2(6)
C12	2494(3)	9555(15)	6389(7)	38.8(10)
C35	6717.8(12)	8174(7)	7071(3)	68.2(12)
C34	7520(20)	2250(70)	10080(40)	70(5)
C7	3950(3)	8693(12)	10313(5)	39.9(7)
C36	4655.8(15)	2947(9)	8941(3)	82.2(16)
C8A	4454(4)	9104(14)	10836(6)	40.8(7)
C31A	7066(3)	2410(16)	9588(6)	40.6(6)
C33A	6619(2)	2691(12)	8224(5)	37.8(6)
C32A	6987(2)	2207(11)	8630(6)	39.1(6)
C34A	7510(30)	2050(90)	9980(60)	70(5)
O12A	4724(2)	4625(11)	8658(5)	97(2)
O2A	3637(3)	7328(12)	8808(6)	39.1(7)
O1A	4154(3)	9072(17)	9305(7)	39.0(7)
C7A	4097(4)	8522(15)	10278(6)	39.9(7)
C8	4293(3)	9222(11)	10963(5)	40.9(7)

Atom	x	y	z	$U_{eq}$
O1AA	3816(7)	9490(30)	9293(12)	39.3(6)
C7AA	3679(9)	8920(40)	10229(17)	39.7(7)
O2AA	3958(6)	6710(30)	8898(11)	39.1(7)
C8AA	4051(10)	9010(40)	10902(18)	40.3(7)
O12	4455(3)	4740(15)	9050(7)	97(2)
C14A	2997(3)	10000(20)	7428(11)	37.2(10)
C13A	2610(2)	10227(13)	7055(5)	38.1(10)
C12A	2513(2)	9828(12)	6131(5)	38.8(10)
C11A	2794(3)	9171(12)	5547(7)	38.9(10)

### Anisotrope Temperaturfaktoren [ $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ]

Atom	$U_{11}$	$U_{22}$	$U_{33}$	$U_{23}$	$U_{13}$	$U_{12}$
O4	24.4(8)	16.0(9)	26.3(8)	0.1(6)	2.2(6)	-3.1(6)
O3	22.5(8)	21.3(9)	37.5(9)	-7.1(8)	-2.7(7)	-0.6(7)
O9	36.5(9)	18.4(9)	25.7(8)	-0.6(7)	3.2(7)	3.4(7)
O5	30.7(9)	21(1)	37.0(9)	2.4(8)	6.0(7)	-5.5(7)
O8	34.2(9)	16.1(9)	36.7(9)	1.1(7)	0.0(7)	0.0(7)
O6	31.2(9)	15.6(9)	37.6(9)	3.1(7)	5.1(7)	2.2(7)
O10	46.4(12)	48.4(15)	34.5(10)	-8.3(10)	9.2(9)	4(1)
O11	34.5(10)	54.7(15)	40.8(11)	2.3(11)	1.2(8)	5.7(10)
O7	37.9(11)	21.0(11)	71.9(15)	-4.9(10)	-13.2(10)	7.0(8)
N2	29.2(10)	37.7(14)	29.8(10)	-5.7(10)	-5.9(8)	5.8(10)
N1	23.2(9)	19.2(11)	37.7(11)	7.1(9)	-1.4(8)	-2.7(8)
C22	22.2(11)	14.7(11)	30.1(11)	-1.3(9)	-2.7(9)	4.0(9)
O2	47.5(15)	41.3(14)	28.2(9)	5(1)	-3.7(10)	-14.3(12)
O1	48.1(15)	42.3(12)	26.4(9)	3.8(8)	-5.7(11)	-14.3(13)
C18	24.5(11)	19.0(13)	28.1(11)	-2.9(10)	-0.5(9)	0.9(9)
C4	25.6(11)	20.7(13)	29.9(11)	0.8(10)	-2.5(9)	-2(1)
C19	27.1(11)	21.0(13)	27.8(11)	-5.2(10)	-5.2(9)	2.5(10)
C24	24.9(11)	19.2(13)	27.8(11)	-1.8(9)	0.7(9)	-2.0(9)
C26	29.7(12)	16.4(13)	35.5(13)	-4.3(10)	2.4(10)	1.8(10)
C3	26.7(12)	21.4(13)	32.6(12)	1.6(10)	0.5(9)	1.3(10)
C10	28.8(13)	39.3(18)	40.8(14)	-6.3(13)	-5.1(11)	6.3(12)
C20	34.8(13)	26.6(14)	23.9(11)	-1.5(10)	-0.2(9)	4.3(11)
C5	28.6(12)	21.9(13)	27.2(11)	1.8(10)	-1.6(9)	-3.4(10)
C2	31.8(12)	27.8(15)	31.9(12)	9.6(11)	-8.2(10)	-5.0(11)
C27	44.8(14)	19.2(13)	27.4(11)	-0.1(10)	8.1(10)	-2.0(11)
C15	30.0(13)	27.5(15)	32.7(13)	0.3(10)	6.3(10)	1.2(10)
C25	29.2(11)	16.6(13)	33.5(12)	0.1(10)	6.6(9)	0.9(9)
C16	25.3(13)	58(2)	36.0(14)	6.9(14)	-4.9(10)	-7.9(13)
C17	27.1(12)	49.0(19)	27.0(11)	5.0(12)	-4.7(9)	-4.2(12)
C23	21.4(11)	16.6(12)	32.5(12)	0.6(10)	4.0(9)	-1.7(9)
C9	29.8(12)	23.8(14)	38.3(14)	-2.3(11)	0(1)	0.4(10)
C28	50.7(10)	32.1(11)	26.9(8)	-1.9(8)	1.3(8)	7.7(9)
C14	28.5(14)	41(2)	42(3)	-4(2)	-1.5(14)	6.3(13)
C1	33.4(13)	22.6(13)	30.3(12)	3(1)	-4.1(10)	-7.8(11)
C6	47.7(13)	40.7(12)	27.2(8)	3.4(8)	-4.7(9)	-14.1(11)
C29	54.1(11)	39.2(12)	29.8(9)	-5.5(9)	1.5(8)	6.7(10)
C21	32.4(14)	42.9(19)	39.5(14)	5.3(13)	8.7(11)	1.3(12)
C31	54.4(12)	36.3(14)	30.8(9)	-2.5(10)	-3.1(10)	11(1)
C13	29.0(12)	42(2)	42(3)	-3(2)	-1.9(13)	7.0(11)
C33	51.6(12)	33.7(13)	27.8(9)	-2.2(10)	-0.9(9)	10.5(10)
C11	29.1(13)	44(2)	43(3)	-1(2)	-3.4(14)	6.2(13)
C30	56.7(11)	40.2(12)	31.0(9)	-3.6(9)	-2.0(8)	9.7(10)
C32	52.9(12)	34.9(14)	29.9(9)	-2.3(10)	-1.7(9)	11.4(10)
C12	29.0(12)	44(2)	43(3)	-1(2)	-2.3(13)	6.8(11)
C35	43.6(19)	87(3)	74(2)	-22(2)	-16.4(17)	7(2)
C34	81(4)	80(10)	48(11)	-7(8)	-15(6)	49(7)

Atom	$U_{11}$	$U_{22}$	$U_{33}$	$U_{23}$	$U_{13}$	$U_{12}$
C7	48.8(15)	43.5(12)	27.2(9)	4.0(9)	-5.4(11)	-13.9(13)
C36	70(3)	115(5)	61(2)	2(3)	3(2)	-23(3)
C8A	49.1(17)	45.0(13)	28.0(11)	3.7(10)	-5.3(13)	-14.0(15)
C31A	54.3(12)	36.4(14)	31(1)	-2.5(10)	-2.9(10)	11.2(11)
C33A	51.7(12)	33.7(13)	28.0(9)	-2(1)	-0.9(10)	10.6(10)
C32A	52.8(12)	34.8(14)	29.7(9)	-2.4(10)	-1.8(9)	11.2(10)
C34A	81(4)	80(10)	48(11)	-8(8)	-16(7)	49(7)
O12A	72(3)	110(5)	110(4)	53(4)	14(3)	23(3)
O2A	47.8(15)	41.2(14)	28.2(9)	4.9(10)	-3.8(11)	-14.8(12)
O1A	48.3(15)	42.2(12)	26.4(9)	4.0(9)	-5.6(11)	-14.2(13)
C7A	48.6(15)	43.5(12)	27.2(9)	4.1(9)	-5.3(11)	-13.9(13)
C8	49.3(17)	44.9(13)	28.1(11)	3.7(10)	-5.3(13)	-13.3(15)
O1AA	48.2(15)	42.2(12)	27.2(8)	4.1(8)	-4.8(10)	-14.1(12)
C7AA	48.6(16)	43.2(13)	27.1(10)	4(1)	-5.2(12)	-13.9(14)
O2AA	47.9(16)	41.1(15)	28.1(11)	4.5(11)	-3.8(12)	-14.4(13)
C8AA	48.9(16)	44.1(13)	27.6(11)	3.9(10)	-5.3(13)	-13.8(14)
O12	73(3)	112(5)	108(4)	54(4)	16(3)	22(3)
C14A	28.6(14)	41(2)	42(3)	-4(2)	-1.3(14)	6.4(13)
C13A	28.9(12)	43(2)	43(3)	-3.0(19)	-1.8(13)	7.2(11)
C12A	28.9(12)	44(2)	43(3)	-1.6(19)	-2.8(13)	6.7(11)
C11A	29.0(13)	45(2)	43(3)	-1(2)	-3.1(13)	6.1(13)

### Bindungslängen [Å]

O4	C22	1.338(3)	C15	C21	1.510(4)
O4	C23	1.437(3)	C25	C23	1.511(4)
O3	C22	1.217(3)	C16	C17	1.378(4)
O9	C27	1.344(3)	C9	C14	1.368(18)
O9	C25	1.438(3)	C9	C14A	1.427(13)
O5	C24	1.219(3)	C28	C33A	1.386(5)
O8	C26	1.261(3)	C28	C29	1.391(3)
O6	C24	1.299(3)	C28	C33	1.391(4)
O10	C27	1.211(4)	C14	C13	1.383(11)
O11	C35	1.409(5)	C1	C6	1.522(4)
O7	C26	1.243(3)	C6	O2A	1.188(10)
N2	C10	1.368(4)	C6	O1AA	1.22(2)
N2	C4	1.373(3)	C6	O1A	1.362(11)
N1	C2	1.492(3)	C6	O2AA	1.39(2)
N1	C3	1.492(3)	C29	C30	1.388(3)
C22	C18	1.480(3)	C31	C32	1.391(4)
O2	C6	1.223(8)	C31	C30	1.394(5)
O1	C6	1.312(10)	C31	C34	1.48(7)
O1	C7	1.457(9)	C13	C12	1.427(11)
C18	C17	1.388(3)	C33	C32	1.394(4)
C18	C19	1.395(3)	C11	C12	1.409(12)
C4	C5	1.365(4)	C30	C31A	1.364(11)
C4	C3	1.480(3)	C7	C8	1.504(9)
C19	C20	1.380(4)	C36	O12A	1.367(10)
C24	C23	1.515(4)	C36	O12	1.533(12)
C26	C25	1.531(4)	C8A	C7A	1.476(11)
C10	C11A	1.398(11)	C31A	C32A	1.390(5)
C10	C9	1.412(4)	C31A	C34A	1.57(9)
C10	C11	1.431(13)	C33A	C32A	1.386(5)
C20	C15	1.392(4)	O1A	C7A	1.462(11)
C5	C9	1.433(4)	O1AA	C7AA	1.48(3)
C5	C1	1.497(3)	C7AA	C8AA	1.54(4)
C2	C1	1.538(4)	C14A	C13A	1.387(9)
C27	C28	1.483(4)	C13A	C12A	1.379(9)
C15	C16	1.391(4)	C12A	C11A	1.355(9)

# Bindungswinkel (°)

C22	O4	C23	117.03(18)	C10	C9	C14A	115.3(5)
C27	O9	C25	116.9(2)	C14	C9	C5	130.0(6)
C10	N2	C4	108.1(2)	C10	C9	C5	105.9(2)
C2	N1	C3	113.07(19)	C14A	C9	C5	138.8(5)
O3	C22	O4	123.2(2)	C33A	C28	C29	122.6(4)
O3	C22	C18	125.3(2)	C29	C28	C33	116.6(4)
O4	C22	C18	111.5(2)	C33A	C28	C27	118.7(4)
C6	O1	C7	116.6(6)	C29	C28	C27	118.2(2)
C17	C18	C19	119.7(2)	C33	C28	C27	124.9(3)
C17	C18	C22	121.4(2)	C9	C14	C13	118.7(11)
C19	C18	C22	118.8(2)	C5	C1	C6	114.0(2)
C5	C4	N2	110.2(2)	C5	C1	C2	109.2(2)
C5	C4	C3	126.1(2)	C6	C1	C2	107.7(2)
N2	C4	C3	123.7(2)	O2	C6	O1	121.7(5)
C20	C19	C18	119.9(2)	O2A	C6	O1A	125.6(7)
O5	C24	O6	125.8(2)	O1AA	C6	O2AA	119.1(12)
O5	C24	C23	118.7(2)	O2A	C6	C1	127.7(5)
O6	C24	C23	115.5(2)	O1AA	C6	C1	119.8(9)
O7	C26	O8	126.7(3)	O2	C6	C1	124.1(4)
O7	C26	C25	115.6(2)	O1	C6	C1	112.1(4)
O8	C26	C25	117.7(2)	O1A	C6	C1	104.8(5)
C4	C3	N1	107.7(2)	O2AA	C6	C1	117.2(8)
N2	C10	C11A	126.6(4)	C30	C29	C28	119.8(3)
N2	C10	C9	108.8(2)	C32	C31	C30	116.4(6)
C11A	C10	C9	124.4(5)	C32	C31	C34	122(2)
N2	C10	C11	132.6(6)	C30	C31	C34	121(2)
C9	C10	C11	117.7(5)	C14	C13	C12	120.0(9)
C19	C20	C15	121.1(2)	C28	C33	C32	123.4(5)
C4	C5	C9	107.0(2)	C12	C11	C10	117.8(9)
C4	C5	C1	122.3(2)	C31A	C30	C29	118.0(5)
C9	C5	C1	130.6(2)	C29	C30	C31	123.6(4)
N1	C2	C1	111.0(2)	C31	C32	C33	120.0(6)
O10	C27	O9	122.9(3)	C11	C12	C13	121.2(8)
O10	C27	C28	125.3(2)	O1	C7	C8	105.7(6)
O9	C27	C28	111.8(2)	C30	C31A	C32A	121.6(8)
C16	C15	C20	118.1(2)	C30	C31A	C34A	119(3)
C16	C15	C21	120.5(3)	C32A	C31A	C34A	119(3)
C20	C15	C21	121.4(2)	C28	C33A	C32A	116.0(6)
O9	C25	C23	106.4(2)	C33A	C32A	C31A	121.6(8)
O9	C25	C26	112.5(2)	C6	O1A	C7A	115.6(7)
C23	C25	C26	110.3(2)	O1A	C7A	C8A	107.6(7)
C17	C16	C15	121.6(2)	C6	O1AA	C7AA	122(2)
C16	C17	C18	119.7(2)	O1AA	C7AA	C8AA	107(2)
O4	C23	C25	106.02(19)	C13A	C14A	C9	119.5(9)
O4	C23	C24	113.33(19)	C12A	C13A	C14A	122.1(7)
C25	C23	C24	109.8(2)	C11A	C12A	C13A	121.1(6)
C14	C9	C10	124.0(6)	C12A	C11A	C10	117.5(7)

# Torsionswinkel (°)

C23	O4	C22	O3	-0.9(3)	O9	C27	C28	C29	-172.2(3)
C23	O4	C22	C18	177.0(2)	O10	C27	C28	C33	-166.1(5)
O3	C22	C18	C17	-156.3(3)	O9	C27	C28	C33	14.5(6)
O4	C22	C18	C17	25.9(3)	C10	C9	C14	C13	0.4(19)
O3	C22	C18	C19	28.3(4)	C5	C9	C14	C13	-175.4(7)
O4	C22	C18	C19	-149.5(2)	C4	C5	C1	C6	-135.9(3)
C10	N2	C4	C5	0.2(3)	C9	C5	C1	C6	48.6(4)
C10	N2	C4	C3	-178.8(3)	C4	C5	C1	C2	-15.3(4)
C17	C18	C19	C20	-0.8(4)	C9	C5	C1	C2	169.1(3)
C22	C18	C19	C20	174.7(2)	N1	C2	C1	C5	45.1(3)
C5	C4	C3	N1	-17.4(4)	N1	C2	C1	C6	169.4(2)
N2	C4	C3	N1	161.4(2)	C7	O1	C6	O2	14.1(11)
C2	N1	C3	C4	48.3(3)	C7	O1	C6	C1	178.3(6)
C4	N2	C10	C11A	174.2(5)	C5	C1	C6	O2A	26.7(8)
C4	N2	C10	C9	0.4(4)	C2	C1	C6	O2A	-94.7(7)
C4	N2	C10	C11	-168.1(7)	C5	C1	C6	O1AA	-113.1(12)
C18	C19	C20	C15	1.7(4)	C2	C1	C6	O1AA	125.5(12)
N2	C4	C5	C9	-0.6(3)	C5	C1	C6	O2	5.5(6)
C3	C4	C5	C9	178.3(3)	C2	C1	C6	O2	-115.9(6)
N2	C4	C5	C1	-177.0(2)	C5	C1	C6	O1	-158.2(5)
C3	C4	C5	C1	1.9(4)	C2	C1	C6	O1	80.4(6)
C3	N1	C2	C1	-65.8(3)	C5	C1	C6	O1A	-168.7(6)
C25	O9	C27	O10	0.5(4)	C2	C1	C6	O1A	69.9(6)
C25	O9	C27	C28	179.9(2)	C5	C1	C6	O2AA	89.4(9)
C19	C20	C15	C16	-0.7(4)	C2	C1	C6	O2AA	-32.0(9)
C19	C20	C15	C21	-179.9(3)	C33A	C28	C29	C30	7.3(7)
C27	O9	C25	C23	-153.6(2)	C33	C28	C29	C30	-7.0(6)
C27	O9	C25	C26	85.5(3)	C27	C28	C29	C30	179.2(3)
O7	C26	C25	O9	176.8(2)	C9	C14	C13	C12	3.1(19)
O8	C26	C25	O9	-2.2(3)	C29	C28	C33	C32	3.8(8)
O7	C26	C25	C23	58.2(3)	C27	C28	C33	C32	177.2(5)
O8	C26	C25	C23	-120.8(2)	N2	C10	C11	C12	177.3(6)
C20	C15	C16	C17	-1.2(5)	C9	C10	C11	C12	9.7(10)
C21	C15	C16	C17	178.1(3)	C28	C29	C30	C31A	-4.9(8)
C15	C16	C17	C18	2.0(5)	C28	C29	C30	C31	6.5(7)
C19	C18	C17	C16	-1.0(5)	C32	C31	C30	C29	-2.1(10)
C22	C18	C17	C16	-176.4(3)	C34	C31	C30	C29	178(2)
C22	O4	C23	C25	-161.1(2)	C30	C31	C32	C33	-1.3(11)
C22	O4	C23	C24	78.5(3)	C34	C31	C32	C33	178(2)
O9	C25	C23	O4	-61.3(2)	C28	C33	C32	C31	0.4(11)
C26	C25	C23	O4	61.0(3)	C10	C11	C12	C13	-6.7(13)
O9	C25	C23	C24	61.4(2)	C14	C13	C12	C11	0.2(15)
C26	C25	C23	C24	-176.24(19)	C6	O1	C7	C8	162.3(7)
O5	C24	C23	O4	-179.5(2)	C29	C30	C31A	C32A	0.8(12)
O6	C24	C23	O4	0.6(3)	C29	C30	C31A	C34A	175(3)
O5	C24	C23	C25	62.1(3)	C29	C28	C33A	C32A	-5.2(10)
O6	C24	C23	C25	-117.7(2)	C27	C28	C33A	C32A	-177.0(6)
N2	C10	C9	C14	-177.3(11)	C28	C33A	C32A	C31A	1.0(13)
C11	C10	C9	C14	-6.9(11)	C30	C31A	C32A	C33A	1.1(15)
N2	C10	C9	C14A	178.0(8)	C34A	C31A	C32A	C33A	-173(3)
C11A	C10	C9	C14A	4.0(8)	O2A	C6	O1A	C7A	-10.6(14)
N2	C10	C9	C5	-0.7(4)	C1	C6	O1A	C7A	-175.6(7)
C11A	C10	C9	C5	-174.7(5)	C6	O1A	C7A	C8A	171.5(9)
C11	C10	C9	C5	169.7(6)	O2AA	C6	O1AA	C7AA	-22(3)
C4	C5	C9	C14	177.1(12)	C1	C6	O1AA	C7AA	-179.0(17)
C1	C5	C9	C10	-6.8(13)	C6	O1AA	C7AA	C8AA	103(3)
C4	C5	C9	C10	0.8(3)	C10	C9	C14A	C13A	0.3(14)
C1	C5	C9	C10	176.8(3)	C5	C9	C14A	C13A	178.3(5)
C4	C5	C9	C14A	-177.4(11)	C9	C14A	C13A	C12A	-2.6(15)
C1	C5	C9	C14A	-1.3(12)	C14A	C13A	C12A	C11A	0.7(12)
O10	C27	C28	C33A	179.4(5)	C13A	C12A	C11A	C10	3.3(11)
O9	C27	C28	C33A	0.0(6)	N2	C10	C11A	C12A	-178.7(5)
O10	C27	C28	C29	7.2(5)	C9	C10	C11A	C12A	-5.8(9)

Wasserstoff-Atomkoordinaten [ $\text{\AA}^2 \times 10^4$ ] und äquivalente isotrope Temperaturfaktoren [ $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ]

Atom	x	y	z	$U_{eq}$
H6	5740	-1160	6514	42
H11B	6368	6459	6625	65
H2	3506	7854	4882	39
H1A	4782	7905	6418	32
H1B	4563	9528	6407	32
H19	5811	3175	2943	30
H3A	4307	8073	5174	32
H3B	4263	6384	5795	32
H20	6332	4311	2078	34
H2A	4633	8462	7921	37
H2B	4375	6843	7595	37
H25	5293	3671	7516	32
H16	7059	4202	4364	48
H17	6533	3209	5256	41
H23	5213	2906	5911	28
H14	3146	10142	8130	45
H1	4091	10327	7769	35
H29	6200	3880	10185	49
H21A	7258	4165	2325	57
H21B	7264	5841	2958	57
H21C	6991	5781	2045	57
H13	2466	10525	7735	46
H33	6641	3032	7632	45
H11	2653	8406	5146	47
H30	6812	3032	10829	51
H30A	6839	3212	10816	51
H32	7272	2447	8271	47
H12	2220	9694	6239	47
H35A	6977	8598	6880	102
H35B	6740	7715	7698	102
H35C	6525	9114	7056	102
H34A	7623	3263	10393	105
H34B	7700	1869	9609	105
H34C	7482	1328	10535	105
H7A	3903	7445	10351	48
H7B	3703	9299	10475	48
H8AA	4692	8536	10608	61
H8AB	4418	8808	11485	61
H8AC	4483	10346	10776	61
H33A	6563	2542	7585	45
H32A	7186	1736	8252	47
H34D	7538	2575	10590	105
H34E	7699	2530	9560	105
H34F	7547	809	10033	105
H7AA	4071	7262	10311	48
H7AB	3852	9042	10523	48
H8A	4365	10416	10844	61
H8B	4523	8487	10856	61
H8C	4211	9102	11604	61
H7AC	3574	7742	10198	48
H7AD	3467	9690	10448	48
H8AD	4282	8510	10599	60
H8AE	3996	8362	11465	60
H8AF	4107	10202	11062	60
H14A	3057	10323	8047	45
H13A	2409	10664	7440	46
H12A	2250	10013	5906	47
H11A	2734	8956	4916	47



## 9.5.2 S-104

Die kristallographischen Daten für diese Struktur sind unter der CCDC-Nummer 1532350 hinterlegt und können kostenlos unter der folgenden Internetadresse abgerufen werden:

[www.ccdc.cam.ac.uk/structures](http://www.ccdc.cam.ac.uk/structures).

### Kristall- und Strukturdaten für S-104:

CCDC-Nr.	1532350
Summenformel	$\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{BrN}_2\text{O}_2$
Kalkulierte Dichte	$1,498 \text{ g cm}^{-3}$
Absorptionskoeffizient	$3,891 \mu\text{mm}^{-1}$
Molare Masse	325,20 g/mol
Farbe	farblos
Kristallbeschreibung	Prisma
Kristallgröße	$0,36 \times 0,17 \times 0,10 \text{ mm}^3$
Temperatur	123,00(10) K
Kristallsystem	orthorhombic
Flack Parameter	-0.025(6)
Hooft Parameter	-0.007(6)
Raumgruppe	$P2_12_12$
Gitterkonstanten	$a = 28,07952(18) \text{ \AA}$ , $\alpha = 90^\circ$ $b = 10,21829(6) \text{ \AA}$ , $\beta = 90^\circ$ $c = 5,02462(4) \text{ \AA}$ , $\gamma = 90^\circ$
Volumen	$1441,687(18) \text{ \AA}^3$
Z	4
Z'	1
Wellenlänge	$1,54184 \text{ \AA}$
Radiation type	$\text{CuK}\alpha$
$\theta_{\min}^\circ$	3,148 [e- $\text{\AA}^{-3}$ ]
$\theta_{\max}^\circ$	73,976 [e- $\text{\AA}^{-3}$ ]
Reflexe (gemessen)	40092
Reflexe (unabhängig)	2922
Anzahl der benutzten Reflexe	2898
$R_{\text{int}}$	0,0538
Parameter	180
Einschränkungsbeefhle	0
Largest Peak	0,697
Deepest Hole	-0,321
Goodness-of-fit $F^2$	1,075
R Indices (alle Daten)	$R_1 = 0,0275$ , $wR_2 = 0,0703$
Finale R Indices [ $I > 2\sigma(I)$ ]	$R_1 = 0,0272$ , $wR_2 = 0,0700$

# Kohlenstoff-Atomkoordinaten [ $\text{\AA}^2 \times 10^4$ ] und äquivalente isotrope Temperaturfaktoren [ $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ]

Atom	x	y	z	$U_{eq}$
Br(1)	7987.1(2)	5771.1(3)	-1402.1(6)	20.31(11)
O(1)	6842.5(8)	3805(2)	6342(6)	24.7(5)
O(2)	6081.0(8)	3373(2)	5296(5)	26.4(5)
N(2)	6535.5(10)	8324(3)	7757(6)	23.5(6)
N(1)	7254.1(9)	6154(3)	3476(6)	21.4(5)
C(4)	6681.5(11)	7432(3)	5880(7)	19.9(6)
C(3)	6345.9(11)	6486(3)	5553(6)	18.0(6)
C(2)	6410.3(10)	5352(3)	3688(7)	20.1(6)
C(12)	6849.0(11)	5576(3)	1921(6)	23.8(7)
C(6)	5965.6(11)	6767(3)	7370(7)	19.8(6)
C(5)	7149.6(11)	7498(3)	4485(7)	21.8(6)
C(7)	6099.9(11)	7926(3)	8724(7)	22.5(6)
C(1)	6475.1(11)	4095(3)	5254(6)	20.2(6)
C(11)	5531.2(11)	6164(3)	8041(7)	26.4(7)
C(14)	5668.8(13)	1381(3)	6053(10)	37.0(9)
C(10)	5258.5(12)	6707(4)	10029(8)	33.4(8)
C(8)	5823.3(13)	8476(4)	10737(8)	30.6(8)
C(13)	6107.8(13)	2142(3)	6740(9)	32.9(9)
C(9)	5402.4(13)	7855(4)	11347(9)	36.5(8)

## Anisotrope Temperaturfaktoren [ $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ]

Atom	$U_{11}$	$U_{22}$	$U_{33}$	$U_{23}$	$U_{13}$	$U_{12}$
Br(1)	21.71(16)	22.53(16)	16.69(17)	1.06(12)	-1.10(12)	0.53(11)
O(1)	23.4(10)	24.2(10)	26.5(12)	0.3(10)	-7(1)	1.8(8)
O(2)	23.2(10)	23.2(11)	32.9(14)	7.5(10)	-6.8(10)	-2.2(9)
N(2)	24.5(12)	17.5(12)	28.6(16)	-0.4(11)	-2.3(12)	0.3(10)
N(1)	19.3(11)	29.0(14)	16.0(13)	5.3(12)	0.9(11)	2.6(9)
C(4)	19.9(13)	18.3(13)	21.4(17)	4.1(13)	-2.9(12)	-0.2(11)
C(3)	20.2(13)	18.2(14)	15.5(15)	1.2(12)	-2.4(12)	1.8(11)
C(2)	21.0(13)	23.5(14)	15.7(15)	2.0(12)	-4.8(13)	-0.6(11)
C(12)	24.1(14)	32.4(17)	14.8(16)	-1.8(13)	-1.5(12)	1.6(12)
C(6)	19.2(14)	21.8(14)	18.6(15)	2.8(12)	-2.9(12)	3.1(12)
C(5)	22.1(14)	19.8(14)	23.3(16)	5.1(12)	-1.7(12)	-0.6(11)
C(7)	23.9(14)	23.0(14)	20.5(16)	0.8(14)	-2.8(14)	6.7(11)
C(1)	21.7(14)	20.7(14)	18.2(15)	-4.8(13)	-0.2(11)	0.7(12)
C(11)	20.1(14)	31.6(16)	28(2)	6.5(13)	-1.8(13)	2.0(12)
C(14)	36.0(18)	24.9(16)	50(3)	7.2(19)	-1.1(19)	-0.4(14)
C(10)	21.5(15)	48(2)	31(2)	8.6(17)	4.7(15)	4.0(15)
C(8)	35.0(17)	30.5(17)	26.4(19)	-4.2(15)	-2.2(15)	12.2(14)
C(13)	29.7(16)	26.8(16)	42(2)	13.6(17)	-6.5(17)	0.1(13)
C(9)	31.6(16)	50(2)	28(2)	1(2)	7.0(17)	16.6(15)

**Bindungslängen [ $\text{\AA}$ ]**

O(1)	C(1)	1.205(4)	C(2)	C(12)	1.536(4)
O(2)	C(1)	1.330(4)	C(2)	C(1)	1.517(4)
O(2)	C(13)	1.454(4)	C(6)	C(7)	1.417(5)
N(2)	C(4)	1.374(4)	C(6)	C(11)	1.408(4)
N(2)	C(7)	1.378(4)	C(7)	C(8)	1.394(5)
N(1)	C(12)	1.501(4)	C(11)	C(10)	1.376(5)
N(1)	C(5)	1.494(4)	C(14)	C(13)	1.498(5)
C(4)	C(3)	1.360(4)	C(10)	C(9)	1.406(6)
C(4)	C(5)	1.491(4)	C(8)	C(9)	1.376(5)
C(3)	C(2)	1.502(4)			
C(3)	C(6)	1.434(5)			

**Bindungswinkel ( $^{\circ}$ )**

C(1)	O(2)	C(13)	116.4(3)	C(11)	C(6)	C(3)	135.2(3)
C(4)	N(2)	C(7)	108.1(3)	C(11)	C(6)	C(7)	118.8(3)
C(5)	N(1)	C(12)	112.9(2)	C(4)	C(5)	N(1)	106.9(2)
N(2)	C(4)	C(5)	123.8(3)	N(2)	C(7)	C(6)	108.3(3)
C(3)	C(4)	N(2)	110.3(3)	N(2)	C(7)	C(8)	129.2(3)
C(3)	C(4)	C(5)	125.9(3)	C(8)	C(7)	C(6)	122.5(3)
C(4)	C(3)	C(2)	122.7(3)	O(1)	C(1)	O(2)	124.6(3)
C(4)	C(3)	C(6)	107.3(3)	O(1)	C(1)	C(2)	123.2(3)
C(6)	C(3)	C(2)	129.9(3)	O(2)	C(1)	C(2)	112.2(3)
C(3)	C(2)	C(12)	110.0(2)	C(10)	C(11)	C(6)	118.7(4)
C(3)	C(2)	C(1)	110.1(3)	C(11)	C(10)	C(9)	121.2(3)
C(1)	C(2)	C(12)	109.3(3)	C(9)	C(8)	C(7)	117.0(3)
N(1)	C(12)	C(2)	111.5(3)	O(2)	C(13)	C(14)	106.9(3)
C(7)	C(6)	C(3)	106.0(3)	C(8)	C(9)	C(10)	121.8(4)

**Wasserstoff-Atomkoordinaten [ $\text{\AA}^2 \times 10^4$ ] und äquivalente isotrope Temperaturfaktoren [ $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ]**

Atom	x	y	z	$U_{eq}$
H(2)	6689.34	9011.55	8243.99	28
H(1A)	7331(14)	5690(40)	4800(100)	26
H(2A)	6127.36	5272.15	2557.86	24
H(12A)	6948.6	4749.26	1153.46	29
H(12B)	6765.38	6161.2	474.77	29
H(5A)	7396.84	7780.81	5704.68	26
H(5B)	7134.32	8114.24	3018.5	26
H(11)	5430.63	5413.15	7158.02	32
H(14A)	5658.41	1234.74	4166.94	55
H(14B)	5392.19	1866.61	6589.7	55
H(14C)	5674.25	555.41	6962.98	55
H(10)	4973.72	6307.54	10510.97	40
H(8)	5918.91	9229.71	11628.04	37
H(13A)	6121.73	2301.84	8640.93	39
H(13B)	6390.34	1659.44	6218.68	39
H(9)	5207.84	8204.06	12666.02	44
H(1B)	7503(17)	6210(50)	2180(100)	38(12)

### 9.5.3 R-110

Die kristallographischen Daten für diese Struktur sind unter der CCDC-Nummer: 1863073 hinterlegt und können kostenlos unter der folgenden Internetadresse abgerufen werden: [www.ccdc.cam.ac.uk/structures](http://www.ccdc.cam.ac.uk/structures).

#### Kristall- und Strukturdaten für R-110:

CCDC-Nr.	1863073
Summenformel	$\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{BrN}_2\text{O}_3$
Kalkulierte Daten	$1,446 \text{ g cm}^{-3}$
Adsorptions- koeffizient	$3.020 \mu\text{mm}^{-1}$
Molare Masse	431,32 g/mol
Farbe	farblos
Kristallbeschreibung	Nadel
Kristallgröße	$0,34 \times 0,08 \times 0,03 \text{ mm}^3$
Temperatur	122,97(11) K
Kristallsystem	orthorhombic
Flack Parameter	0,01(2)
Hoof Parameter	0,012(12)
Raumgruppe	$P2_12_12_1$
Gitterkonstante	$a = 5,09863(19) \text{ \AA}$ , $b = 9,7881(3) \text{ \AA}$ , $\beta = 90^\circ$ $c = 39,7125(13) \text{ \AA}$ ,
Volumen	$1981,90(11) \text{ \AA}^3$
Z	4
Z'	1
$\Theta_{\min}^\circ$	4,454 [e- $\text{\AA}^{-3}$ ]
$\Theta_{\max}^\circ$	76,480 [e- $\text{\AA}^{-3}$ ]
Reflexe (gemessen).	30021
Reflexe (unabhängig)	3985
Anzahl der benutzen Reflexe	3822
$R_{\text{int}}$	0,0993
Parameter	245
Einschränkungs- befehle	18
Largest Peak	1,616
Deepest Hole	-1,770
Goodness-of-fit $F^2$	1,101
R Indices (alle Daten)	$R_1 = 0,0685$ , $wR_2 = 0,1504$
Finale R Indices	$R_1 = 0,0655$ $wR_2 = 0,1492$

**Kohlenstoff-Atomkoordinaten [ $\text{\AA}^2 \times 10^4$ ] und äquivalente isotrope Temperaturfaktoren [ $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ]**

Atom	x	y	z	$U_{eq}$
Br1	8640.0(17)	7042.0(8)	7837.0(2)	14.0(2)
O3	5160(13)	4411(6)	6475.1(14)	16.7(13)
O2	6340(15)	4821(6)	7014.3(13)	16.6(11)
O1	11041(14)	7132(7)	5635.3(13)	21.5(13)
N1	7800(16)	9514(7)	6818.8(17)	17.3(16)
N2	3505(16)	7294(6)	7324.0(15)	13.3(13)
C14	5897(16)	8635(7)	6918.1(19)	10.4(16)
C15	5553(16)	7627(7)	6679.1(19)	10.4(16)
C18	4519(17)	8693(8)	7246.5(19)	13.9(17)
C16	3670(20)	6459(7)	6725.7(17)	11.7(14)
C19	5175(18)	5151(8)	6760.7(19)	12.7(16)
C1	11190(20)	5362(9)	5230(2)	19.9(17)
C17	1950(16)	6689(8)	7038(2)	13.9(17)
C11	8830(20)	9096(7)	6510.7(19)	15.9(16)
C12	10856(18)	9571(8)	6318(2)	15.4(18)
C9	8022(16)	7209(8)	6113.5(19)	13.8(16)
C20	6620(20)	3142(8)	6482(2)	20.9(17)
C10	7384(16)	7890(9)	6417.4(18)	12.6(14)
C13	11460(20)	8886(8)	6029.0(19)	16.9(16)
C8	10101(18)	7706(8)	5927.5(19)	13.6(16)
C21	6320(30)	2511(10)	6135(2)	36(3)
C6	10790(20)	5715(11)	4896(2)	26(2)
C5	12300(20)	5125(13)	4646(3)	31(2)
C2	13140(20)	4432(10)	5309(2)	25(2)
C4	14260(20)	4214(11)	4727(3)	30(2)
C7	9590(20)	5987(10)	5508(3)	29(2)
C3	14690(20)	3847(11)	5061(3)	31(2)

**Anisotrope Temperaturfaktoren [ $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ]**

Atom	$U_{11}$	$U_{22}$	$U_{33}$	$U_{23}$	$U_{13}$	$U_{12}$
Br1	10.4(4)	12.1(3)	19.5(3)	0.3(3)	-1.3(3)	1.5(3)
O3	22(4)	11(3)	17(3)	-2(2)	-3(2)	7(2)
O2	13(3)	17(3)	19(2)	2(2)	-2(3)	3(3)
O1	23(4)	23(3)	19(2)	-3(2)	8(2)	-6(3)
N1	26(5)	9(3)	17(3)	1(2)	-3(3)	0(3)
N2	12.0(17)	14.4(17)	13.4(15)	0.1(12)	0.3(12)	0.2(12)
C14	7(5)	6(3)	18(3)	0(3)	-1(3)	5(3)
C15	9(4)	5(3)	17(3)	1(3)	-4(3)	3(3)
C18	10(4)	13(4)	19(4)	-1(3)	1(3)	1(3)
C16	11.2(18)	11.6(17)	12.2(17)	0.5(12)	-0.4(13)	-0.8(13)
C19	13(4)	11(4)	14(3)	2(3)	4(3)	-5(3)
C1	13(5)	21(4)	25(4)	-2(3)	4(4)	-3(4)
C17	3(4)	16(4)	22(4)	-1(3)	-3(3)	0(3)
C11	22(5)	10(3)	16(3)	1(3)	-3(4)	-4(4)
C12	13(5)	8(3)	25(4)	6(3)	-4(3)	-2(3)
C9	12(5)	13(4)	16(3)	1(3)	0(3)	2(3)

Atom	$U_{11}$	$U_{22}$	$U_{33}$	$U_{23}$	$U_{13}$	$U_{12}$
C20	22(2)	20(2)	21(2)	0.4(12)	-0.1(13)	1.3(13)
C10	11(4)	11(3)	15(3)	1(3)	-3(3)	1(3)
C13	13(4)	15(3)	23(4)	5(3)	1(4)	-9(4)
C8	15(4)	10(4)	16(3)	-1(3)	3(3)	-3(3)
C21	63(8)	23(4)	22(4)	-5(3)	3(6)	23(6)
C6	19(6)	30(5)	30(5)	4(4)	4(4)	-3(4)
C5	25(6)	48(6)	22(4)	1(4)	7(4)	-7(5)
C2	23(6)	26(4)	25(4)	2(3)	-2(4)	0(4)
C4	24(7)	30(5)	35(5)	-12(4)	13(4)	-8(4)
C7	35(7)	24(5)	29(5)	-7(4)	10(4)	-14(4)
C3	20(6)	25(5)	48(6)	-4(4)	1(5)	8(4)

### Bindungslängen [Å]

O3	C19	1.346(10)	C1	C6	1.389(13)
O3	C20	1.448(10)	C1	C2	1.384(14)
O2	C19	1.213(11)	C1	C7	1.504(13)
O1	C8	1.375(10)	C11	C12	1.369(13)
O1	C7	1.436(11)	C11	C10	1.440(12)
N1	C14	1.355(11)	C12	C13	1.364(12)
N1	C11	1.392(11)	C9	C10	1.416(11)
N2	C18	1.496(10)	C9	C8	1.381(11)
N2	C17	1.508(10)	C20	C21	1.517(11)
C14	C15	1.380(10)	C13	C8	1.406(11)
C14	C18	1.482(11)	C6	C5	1.384(15)
C15	C16	1.506(11)	C5	C4	1.377(17)
C15	C10	1.421(11)	C2	C3	1.388(14)
C16	C19	1.500(11)	C4	C3	1.393(16)
C16	C17	1.533(11)			

### Bindungswinkel (°)

C19	O3	C20	116.3(6)	O2	C19	C16	123.8(7)
C8	O1	C7	115.8(7)	C6	C1	C7	121.4(10)
C14	N1	C11	109.8(7)	C2	C1	C6	119.0(9)
C18	N2	C17	112.7(6)	C2	C1	C7	119.6(9)
N1	C14	C15	110.1(7)	N2	C17	C16	111.5(7)
N1	C14	C18	124.8(7)	N1	C11	C10	106.0(8)
C15	C14	C18	124.9(8)	C12	C11	N1	132.6(8)
C14	C15	C16	122.6(7)	C12	C11	C10	121.4(7)
C14	C15	C10	106.9(7)	C13	C12	C11	118.3(8)
C10	C15	C16	130.3(7)	C8	C9	C10	117.8(8)
C14	C18	N2	108.0(6)	O3	C20	C21	106.3(7)
C15	C16	C17	110.6(6)	C15	C10	C11	107.2(7)
C19	C16	C15	109.3(8)	C9	C10	C15	133.6(8)
C19	C16	C17	110.1(6)	C9	C10	C11	119.2(8)
O3	C19	C16	112.2(7)	C12	C13	C8	122.2(8)
O2	C19	O3	124.0(8)	O1	C8	C9	125.1(7)

O1	C8	C13	113.9(8)	C1	C2	C3	121.5(9)
C9	C8	C13	121.0(7)	C5	C4	C3	120.3(9)
C5	C6	C1	120.0(10)	O1	C7	C1	107.1(8)
C4	C5	C6	120.5(10)	C2	C3	C4	118.6(10)

**Wasserstoff-Atomkoordinaten [ $\text{\AA}^2 \times 10^4$ ] und äquivalente isotrope Temperaturfaktoren [ $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ]**

Atom	x	y	z	$U_{eq}$
H1	8297.66	10223.02	6929.47	21
H2A	2493.19	7334.48	7506.32	16
H2B	4852.55	6746.94	7370.47	16
H18A	3076.92	9337.59	7235.27	17
H18B	5717.14	8988.62	7421.63	17
H16	2534.13	6397.35	6526.79	14
H17A	517.75	7298.66	6980.44	17
H17B	1201.03	5824.23	7108.37	17
H12	11799.09	10341.6	6382.05	19
H9	7071.17	6452.57	6041.58	17
H20A	5920.23	2534.9	6652.99	25
H20B	8452.9	3314.65	6531.27	25
H13	12817.38	9211.07	5894.5	20
H21A	7101.14	3102.18	5970.26	54
H21B	4496.71	2390.63	6085.43	54
H21C	7189.41	1639.65	6130.76	54
H6	9496.97	6347.83	4839.43	31
H5	11991.59	5345.26	4421.31	38
H2	13415.77	4193.43	5532.58	30
H4	15296.93	3842.37	4557.12	36
H7A	7898.64	6284.75	5422.71	35
H7B	9290.28	5324.82	5686.1	35
H3	15998.87	3222.59	5116.48	37

## 9.5.4 S-110

Die kristallographischen Daten für diese Struktur sind unter der CCDC-Nummer: 1863070 hinterlegt und können kostenlos unter der folgenden Internetadresse abgerufen werden: [www.ccdc.cam.ac.uk/structures](http://www.ccdc.cam.ac.uk/structures).

### Kristall- und Strukturdaten für S-110:

CCDC-Nr.	1863070
Summenformel	$\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{BrN}_2\text{O}_3$
Kalkulierte Dichte	$1,432 \text{ g cm}^{-3}$
Adsorptions- koeffizient	$2,992 \mu\text{mm}^{-1}$
Molare Masse	431,32 g/mol
Farbe	farblos
Kristallbeschreibung	Nadel
Kristallgröße	$0,36 \times 0,05 \times 0,04 \text{ mm}^3$
Temperatur	123,2(6)K
Kristallsystem	orthorhombic
Flack Parameter	-0,04(4)
Space Group	$P2_12_12_1$
Gitterkonstanten	$a = 5,0949(6) \text{ \AA}$ , $\alpha = 90^\circ$ $b = 9,8124(13) \text{ \AA}$ , $\beta = 90^\circ$ $c = 40,009(9) \text{ \AA}$ , $\gamma = 90^\circ$
Volumen	$2000.2(6) \text{ \AA}^3$
Z	4
Z'	1
Wellenlänge	$1,54184 \text{ \AA}$
Radiation type	$\text{CuK}\alpha$
$\theta_{\min}^\circ$	$4,420 [e^- \text{ \AA}^{-3}]$
$\theta_{\max}^\circ$	$63,986 [e^- \text{ \AA}^{-3}]$
Reflexe gemessen	14810
Reflexe (unabhängig).	3196
Anzahl der benutzten Reflexe	2926
$R_{\text{int}}$	0,0832
Parameter	221
Restraints	78
Largest Peak	1,409
Deepest Hole	-1,224
Goodness-of-fit $F^2$	1,045
R Indices (alle Daten))	$R_1 = 0,0639$ , $wR_2 = 0,1577$
Finale R Indices [ $I > 2\sigma(I)$ ]	$R_1 = 0,0593$ , $wR_2 = 0,1550$



**Kohlenstoff-Atomkoordinaten [ $\text{\AA}^2 \times 10^4$ ] und äquivalente isotrope Temperaturfaktoren [ $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ]**

Atom	x	y	z	$U_{eq}$
Br(1)	11361(2)	7044.2(10)	7837.7(2)	17.5(3)
O(3)	-1018(14)	7133(8)	5636.4(16)	21.3(14)
O(1)	4854(15)	4419(7)	6476.3(17)	20.8(16)
O(2)	3687(17)	4821(6)	7014.3(16)	20.1(15)
N(2)	2203(17)	9513(8)	6817(2)	17.7(19)
N(1)	6485(18)	7293(7)	7324.4(18)	14.7(16)
C(7)	5470(20)	8696(10)	7246(2)	16(2)
C(6)	4100(20)	8619(9)	6919(2)	16(2)
C(5)	4450(20)	7635(9)	6680(2)	14(2)
C(4)	6370(20)	6455(9)	6725(2)	15.8(15)
C(14)	8022(18)	6684(10)	7040(2)	15.6(15)
C(3)	4776(19)	5150(10)	6761(2)	15(2)
C(16)	-1195(15)	5360(7)	5227.8(14)	29.4(12)
C(17)	-773(13)	5712(7)	4895.6(16)	29.7(12)
C(18)	-2300(15)	5131(8)	4645.5(12)	30.1(12)
C(19)	-4250(14)	4198(8)	4727.6(15)	30.2(12)
C(20)	-4672(13)	3846(7)	5059.8(17)	30.1(12)
C(21)	-3145(16)	4427(7)	5309.9(12)	29.8(12)
C(12)	-117(13)	7723(6)	5925.4(12)	18.9(10)
C(11)	-1496(11)	8876(6)	6024.2(13)	18.9(10)
C(10)	-820(13)	9546(5)	6318.0(14)	19(1)
C(9)	1236(13)	9061(6)	6513.1(12)	19.1(10)
C(8)	2615(11)	7907(6)	6414.3(13)	18.6(10)
C(13)	1938(12)	7238(5)	6120.5(14)	18.6(10)
C(2)	3390(30)	3137(10)	6481(3)	28(3)
C(15)	440(30)	5988(12)	5506(3)	31(3)
C(1)	3680(30)	2519(11)	6135(3)	37(3)

**Anisotrope Temperaturfaktoren [ $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ]**

Atom	$U_{11}$	$U_{22}$	$U_{33}$	$U_{23}$	$U_{13}$	$U_{12}$
Br(1)	11.9(5)	15.7(4)	24.9(5)	0.6(4)	1.4(4)	-1.2(4)
O(3)	6(4)	29(4)	29(3)	-4(3)	-5(3)	6(4)
O(1)	19(4)	18(4)	26(4)	-2(3)	1(3)	-9(3)
O(2)	20(4)	17(3)	23(3)	0(3)	2(3)	3(4)
N(2)	18(5)	10(4)	25(4)	-1(3)	4(4)	0(3)
N(1)	4(4)	19(4)	21(4)	2(3)	-1(3)	-5(4)
C(7)	10(6)	14(5)	23(5)	-2(4)	1(4)	-3(4)
C(6)	15(6)	13(4)	21(5)	1(4)	0(4)	-6(4)
C(5)	12(6)	9(4)	22(5)	1(3)	5(4)	-2(3)
C(4)	3(4)	20(3)	25(3)	-1(3)	1(3)	2(3)
C(14)	2(4)	20(3)	25(3)	-1(3)	2(3)	2(3)
C(3)	4(5)	21(5)	19(5)	4(4)	-5(4)	2(4)
C(16)	20(3)	32(3)	36(2)	-2(2)	-7(2)	5(2)
C(17)	20(3)	33(3)	36(2)	-2(2)	-7(2)	6(2)
C(18)	21(3)	33(3)	36(2)	-3(2)	-7(2)	6(2)
C(19)	20(3)	33(3)	37(2)	-3(2)	-7(2)	5(2)

Atom	$U_{11}$	$U_{22}$	$U_{33}$	$U_{23}$	$U_{13}$	$U_{12}$
C(20)	20(3)	33(3)	37(2)	-3(2)	-6(2)	5(2)
C(21)	20(3)	32(3)	37(2)	-3(2)	-6(2)	5(2)
C(12)	17(3)	18(2)	22(2)	5.9(18)	5.3(19)	1(2)
C(11)	16(3)	18(2)	23(2)	6.4(18)	5.3(19)	1(2)
C(10)	17(3)	18(2)	23(2)	6.1(18)	5.5(19)	1(2)
C(9)	18(3)	17(2)	22(2)	5.9(18)	5.4(19)	1(2)
C(8)	17(2)	17(2)	22(2)	6.0(18)	5.4(19)	1(2)
C(13)	16(3)	17(2)	22(2)	5.9(18)	5.5(19)	1(2)
C(2)	38(7)	16(5)	30(5)	2(4)	5(5)	-15(6)
C(15)	30(8)	25(6)	39(6)	-7(5)	-10(5)	8(5)
C(1)	55(9)	24(5)	33(6)	0(4)	-8(7)	-16(6)

#### Bindungslängen [Å]

O(3)	C(12)	1.372(8)	C(16)	C(17)	1.3900
O(3)	C(15)	1.444(13)	C(16)	C(21)	1.3900
O(1)	C(3)	1.345(12)	C(16)	C(15)	1.520(12)
O(1)	C(2)	1.464(12)	C(17)	C(18)	1.3900
O(2)	C(3)	1.201(12)	C(18)	C(19)	1.3900
N(2)	C(6)	1.368(13)	C(19)	C(20)	1.3900
N(2)	C(9)	1.386(9)	C(20)	C(21)	1.3900
N(1)	C(7)	1.503(12)	C(12)	C(11)	1.3900
N(1)	C(14)	1.505(12)	C(12)	C(13)	1.3900
C(7)	C(6)	1.488(14)	C(11)	C(10)	1.3900
C(6)	C(5)	1.369(13)	C(10)	C(9)	1.3900
C(5)	C(4)	1.523(13)	C(9)	C(8)	1.3900
C(5)	C(8)	1.443(11)	C(8)	C(13)	1.3900
C(4)	C(14)	1.533(13)	C(2)	C(1)	1.518(14)
C(4)	C(3)	1.522(14)			

#### Bindungswinkel (°)

C(12)	O(3)	C(15)	117.5(7)	C(21)	C(16)	C(15)	119.0(7)
C(3)	O(1)	C(2)	115.6(8)	C(18)	C(17)	C(16)	120.0
C(6)	N(2)	C(9)	107.8(7)	C(17)	C(18)	C(19)	120.0
C(7)	N(1)	C(14)	112.7(7)	C(20)	C(19)	C(18)	120.0
C(6)	C(7)	N(1)	107.3(7)	C(19)	C(20)	C(21)	120.0
N(2)	C(6)	C(7)	124.1(9)	C(20)	C(21)	C(16)	120.0
N(2)	C(6)	C(5)	109.8(9)	O(3)	C(12)	C(11)	114.5(5)
C(5)	C(6)	C(7)	126.1(9)	O(3)	C(12)	C(13)	125.5(5)
C(6)	C(5)	C(4)	122.5(9)	C(11)	C(12)	C(13)	120.0
C(6)	C(5)	C(8)	107.4(8)	C(10)	C(11)	C(12)	120.0
C(8)	C(5)	C(4)	130.0(8)	C(11)	C(10)	C(9)	120.0
C(5)	C(4)	C(14)	109.8(8)	N(2)	C(9)	C(10)	130.7(5)
C(3)	C(4)	C(5)	108.1(8)	N(2)	C(9)	C(8)	109.3(5)
C(3)	C(4)	C(14)	109.9(8)	C(8)	C(9)	C(10)	120.0
N(1)	C(14)	C(4)	113.1(8)	C(9)	C(8)	C(5)	105.6(5)
O(1)	C(3)	C(4)	110.8(8)	C(13)	C(8)	C(5)	134.2(5)
O(2)	C(3)	O(1)	125.8(9)	C(13)	C(8)	C(9)	120.0
O(2)	C(3)	C(4)	123.4(9)	C(8)	C(13)	C(12)	120.0
C(17)	C(16)	C(21)	120.0	O(1)	C(2)	C(1)	106.4(8)
C(17)	C(16)	C(15)	121.0(7)	O(3)	C(15)	C(16)	107.4(9)

**Wasserstoff-Atomkoordinaten [ $\text{\AA}^2 \times 10^4$ ] und äquivalente isotrope Temperaturfaktoren [ $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ]**

Atom	x	y	z	$U_{eq}$
H(2)	1698.24	10228.23	6923.62	21
H(1A)	5134.47	6751.39	7371.93	18
H(1B)	7505.78	7334.62	7504.6	18
H(7A)	4268.05	8995.42	7419.14	19
H(7B)	6916.56	9339.58	7234.65	19
H(4)	7515.58	6390.35	6529.56	19
H(14A)	8750.38	5817.97	7111.53	19
H(14B)	9473.96	7283.34	6985.97	19
H(17)	531.42	6335.69	4840.69	36
H(18)	-2017.94	5365.93	4423.22	36
H(19)	-5272.03	3809.28	4560.24	36
H(20)	-5976.77	3222.38	5114.74	36
H(21)	-3427.42	4192.12	5532.21	36
H(11)	-2871.6	9200.87	5893.7	23
H(10)	-1742.56	10317.75	6384.15	23
H(13)	2861.06	6465.63	6054.36	22
H(2A)	1550.55	3304.56	6531.02	34
H(2B)	4092.74	2527.01	6649.26	34
H(15A)	749.23	5323.62	5680.96	38
H(15B)	2118.95	6288.93	5419.42	38
H(1C)	2867.72	3106.26	5973.31	56
H(1D)	2838.9	1642.52	6130.29	56
H(1E)	5505.2	2416.64	6083.39	56

## **Kapitel 10**

### **Pharmakologisch-experimenteller Teil**

## 10 Pharmakologisch-experimenteller Teil

### 10.1 HDAC-Enzym-Inhibitions-Assay

Die Messung der IC<sub>50</sub>-Werte der synthetisierten Inhibitoren gegen die verschiedenen HDAC-Isoenzyme wurde von der Firma Reaction Biology Corporation (Malvern, Pennsylvania, USA) durchgeführt, wobei humanes rekombinantes Proteinmaterial eingesetzt wurde. Bei den im Folgenden beschriebenen Daten handelt es sich um Informationen, die seitens der Firma Reaction Biology zur Durchführung der Testung erhalten wurden.

Zur Erstellung einer 10 Punkte-Dosis-Wirkungskurve wurde eine dreifache Verdünnungsreihe (1:3) angelegt. Dabei wurde als Startkonzentration für die Testverbindungen 1 µM (in DMSO) gewählt, während diese für die Referenzsubstanzen Trichostatin A<sup>320,321</sup> (TSA, **2**; für HDAC 1, 2, 6, 8 und 10), TMP-269<sup>322</sup> (**112**, für HDAC 4) 10 µM (in DMSO) betrug. Bei den verwendeten Enzymsubstraten handelt es sich um unterschiedliche Fluoreszenz-aktive Proteine, die in einer Konzentration von 50 µM, mit Ausnahme von HDAC8 (100 µM) eingesetzt wurden.

Abhängig von der HDAC-Isoform, standen verschiedene Substrate zur Auswahl:

HDAC-Isoform	K <sub>m</sub> -Werte	Substrat	Substratkonzentration [µM]
HDAC-1	5.2 µM	Sub-177	50
HDAC-2	5.8 µM	Sub-177	50
HDAC-3	3.2 µM	Sub-177	50
HDAC-4	33.4 µM	Klasse 2a Substrat	50
HDAC-5	43.4 µM	Klasse 2a Substrat	50
HDAC-6	13.2 µM	Sub-177	50
HDAC-7	53.5 µM	Klasse 2a Substrat	50
HDAC-8	226.5 µM	Sub-178	100
HDAC-9	63.01 µM	Klasse 2a Substrat	50
HDAC-10	4.3 µM	Sub-177	50
HDAC-11	7.4 µM	Sub-177	50
	27.5 µM	Klasse 2a Substrat	

**Tab. 10.1.** Darstellung der HDAC-Substrate und ihrer K<sub>m</sub>-Werte. **Sub-177:** fluorogenes, acetyliertes Peptid-Substrat basierend auf dem 379-382 Rest von p53 (Arg-His-Lys-Lys (Ac)). **Sub-178:** fluorogenes, diacetyliertes Peptid-Substrat basierend auf dem 379-382 Rest von p53 (Arg-His-Lys(Ac)-Lys(Ac)). Klasse 2a-Substrat: fluorogenes, acetyliertes Peptid-Substrat für HDAC 4,5,7 und 9 (acetyl-Lys(trifluoracetyl)-AMC).

Die Reaktion wurde in einem Volumen von 50 µL, einer Temperatur von 37 °C mit einer Reaktionszeit von 90 min in einer 96 Well Platte durchgeführt. Der für die Reaktion verwendete Puffer bestand aus folgenden Komponenten: 50 mM Tris-HCl (pH = 8,0), 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> sowie frisch zugesetztem Albumin-Serum (bovines, 1 mg / mL).

Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Entwicklungslösung (Fluor de Lys<sup>TM</sup> Developer) zugesetzt. Je nach Konzentration des deacetylierten HDAC-Substrates führte diese mit der Entwicklungslösung zur Bildung eines Fluorophors. Die messbare Fluoreszenz entsprach dabei der HDAC-Restaktivität. Die Fluoreszenz-Messung wurde mit einem Fluoroskan Ascent<sup>TM</sup> FL Fluorometer durchgeführt. Die Berechnung der prozentualen Enzymaktivität erfolgte relativ zur DMSO-Kontrolle. Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden unter Zuhilfenahme des Programms GraphPad Prism (GraphPad Prism 4.0 Software, San Diego, USA) anhand einer sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Gleichung (logarithmierte Substanzkonzentration gegen Enzymaktivität) bestimmt. Sofern nicht anders angegeben, handelt es sich bei den

dargestellten Werten entweder um Doppelbestimmungen - Angabe von Mittelwerten - oder um eine Einfachbestimmung, die lediglich zur Abschätzung der inhibitorischen Fähigkeit herangezogen wurde.

Um die inhibitorische Fähigkeit der Testverbindungen auf die unterschiedlichen HDAC-Isoformen besser miteinander vergleichen zu können, wurden die von der Firma Reaction Biology ermittelten  $IC_{50}$ -Werte mittels der Cheng-Prusoff-Gleichung in die entsprechenden Inhibitor-Enzym-Dissoziationskonstanten (Inhibitionskonstanten  $K_i$ ) umgewandelt.<sup>157,323</sup>

Sofern im Vergleich zu den bereits getesteten Verbindungen innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe schlechtere  $IC_{50}$ -Werte (für HDAC6) für eine neu synthetisierte Testsubstanz erhalten wurden, wurde auf die Testung der inhibitorischen Aktivität dieser Verbindung in Bezug auf andere Isoformen verzichtet.

## **10.2 Zellkultur**

### Allgemeine Arbeitsweise

Die beschriebenen Vorgehensweisen beruhen auf Protokollen von Mandy Beyer (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Krämer, Institut für Toxikologie, Universitätsklinikum Mainz).

Die Durchführung der Zellkultur-Versuche erfolgte stets unter sterilen Bedingungen (Sicherheitswerkbank), wobei das Medium steril bezogen wurde, die verwendeten Pipettenspitzen und Mikrozentrifugenröhrchen vor dem Gebrauch autoklaviert und die Pasteurpipetten hitzesterilisiert (3 Std bei 200 °C) wurden.

### Zelllinie

Für die Durchführung der biologischen Testungen wurden Suspensionszellen von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Krämer zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um MV4-11 Zellen (Humane Zellen vom Phänotyp B der Myelomen Leukämie, American Type Culture Collection, ATCC), die unter bestimmten Bedingungen (37 °C, 5 %  $CO_2$ , 95 % relative Luftfeuchtigkeit) in Regensburg inkubiert wurden.

### Kryokonservierung und Auftauen der MV4-11 Zellen

Um Zellen in einem guten Zustand konservieren zu können, empfiehlt es sich, Zellen aus frühen Passagen zu verwenden, da jeder Passagierschritt für sich eine Stresssituation für diese darstellt. Nach Zählung der Zellen wurde das entsprechende Volumen (40.000.000 Zellen) entnommen, in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt, zentrifugiert (800 x g) und der Überstand abgesaugt. Das auf diese Weise erhaltende Pellet wurde resuspendiert (8 mL FBS (fetales Rinderserum) + 10 % DMSO), aliquotiert (1 mL) und für 24 Std bei -80 °C gelagert. Anschließend erfolgte die Überführung der Kryoröhrchen in einen Dewar, der mit flüssigem Stickstoff gefüllt war.

### Medium

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im RPMI 1640 Medium (s. Kap. 10.5.5), dem zuvor unter sterilen Bedingungen 10 % FBS hitze-inaktiviert, 1 % Glutamin und 1 % einer Penicillin / Streptomycin-Mischung zugesetzt wurden. Das Medium wurde bei 4 °C gelagert und vor dem Gebrauch auf 37 °C erwärmt. FBS wurde hitzeinaktiviert, indem es für 30 min bei 56 °C erwärmt, anschließend auf RT abgekühlt und zu 50 mL aliquotiert wurde. Diese wurden bei -20 °C gelagert.

### Stammlösungen der Substanzen

Stammlösungen der Testsubstanzen (10 mM) sowie der Positivkontrolle MS-275 (6, 5 mM) wurden in DMSO angefertigt, steril filtriert und bei -80 °C gelagert. Direkt vor dem Gebrauch wurde die 10 mM Stocklösung 1:100 und die 5 mM MS-275 (6) Stocklösung 1:10 mit PBS verdünnt.

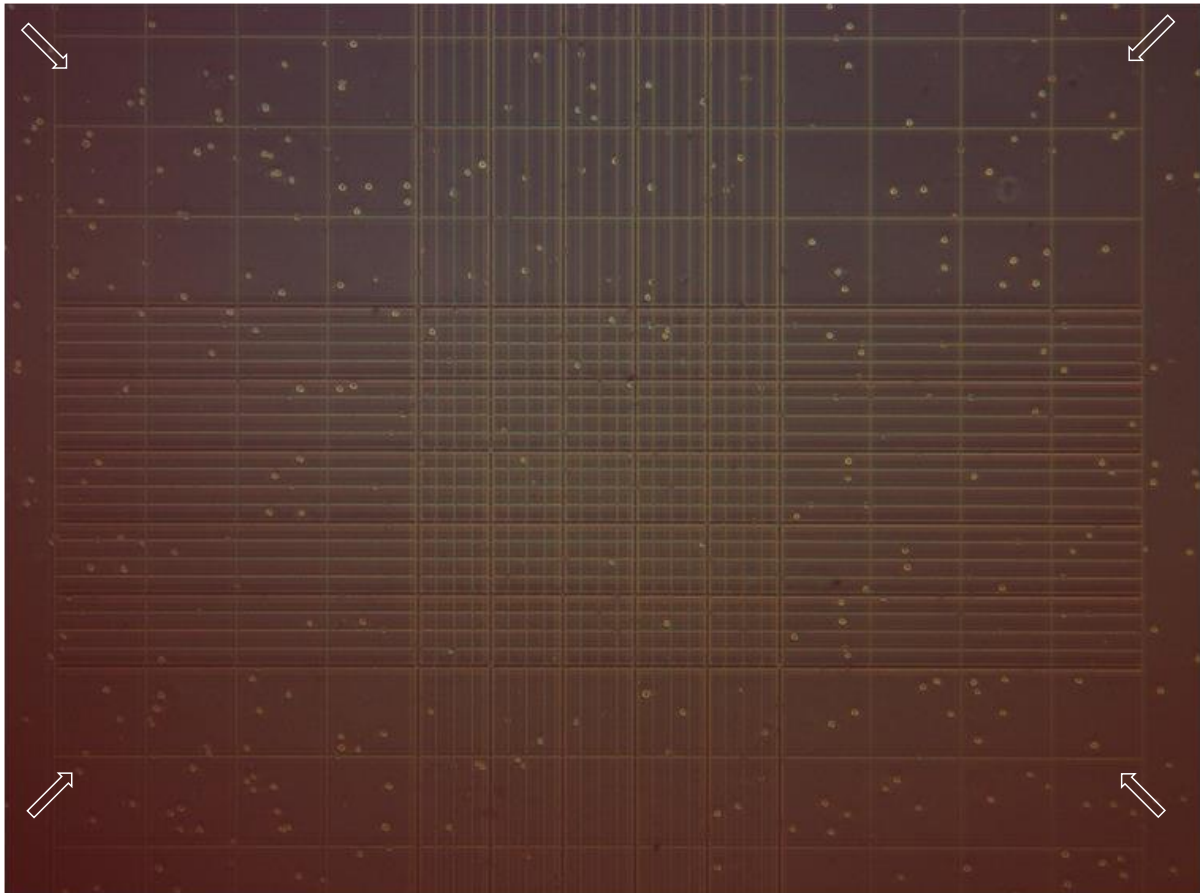
### Erhaltungskultur

Um eine optimale Zelldichte (150.000 - 600.000) für die MV4-11 Zellen gewährleisten zu können, sollte alle 2 bis 3 Tage das Medium gewechselt werden. Dafür wird zunächst mittels einer serologischen Pipette die Suspensionskultur homogen durchmischt und eine kleine Menge (30 µL) für die Bestimmung der Zellzahl entnommen. In einer neuen Zellkulturflasche (75 m<sup>3</sup>) wird das vorgewärmte Medium (10 mL) vorgelegt und das - der oben genannten Zelldichte entsprechende - Volumen (0,8-1,5 mL) an Zellsuspension hinzugegeben. Die Subkultivierung der Zellen kann vom oben genannten Zeitplan abweichen, wenn die



Zellen in ihrer Dichte, ihrem Wachstumsverhalten oder ihrer Morphologie Veränderungen aufweisen, oder ein frühzeitiger Mediumverbrauch (Farbumschlag von Rot auf Gelb) vorliegt.

### Ermittlung der Zellzahl



**Abb. 10.1.** Darstellung der Neubauer-Zählkammer. Die vier Quadranten, die zum Auszählen der Zellen herangezogen werden sind jeweils mit Pfeilen markiert.

Die Zellzahl wird bestimmt, indem man eine kleine Menge (30  $\mu\text{L}$ ) aus der Zellsuspension entnimmt und in ein Eppendorfgefäß (1,5 mL) überführt. Von dieser Probe werden 10  $\mu\text{L}$  in ein weiteres Eppendorfgefäß transferiert, mit der gleichen Menge (10  $\mu\text{L}$ ) Trypanblau-Lösung (s. Kap. 10.5.5) versetzt und nach ausreichender Durchmischung 10  $\mu\text{L}$  der Mischung in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Der in dieser Lösung enthaltene Diazofarbstoff ermöglicht es, die Anzahl der lebenden Zellen zu erfassen. Dies basiert auf dem Prinzip, dass lebende Zellen über eine intakte Zellmembran verfügen und somit das Eindringen des Farbstoffes verhindern, während bei abgestorbenen Zellen dieser ins Zellinnere diffundieren kann und durch die Bindung an zytosolische Proteine die Zellen blau färbt.<sup>324</sup> Intakte Zellen erscheinen hingegen weiß auf blauem Hintergrund und können somit in den vier Quadranten der

Zählkammer gezählt werden (s. **Abb. 10.1**). Zur Ermittlung der Zellzahl (Zellen / mL) wird folgende Formel herangezogen:

$$\frac{\text{gezählte Zellen}}{4} \times 10^4 \times 2$$

Neubauer-Faktor  
 ↓  
 Verdünnungsfaktor ↙

**Abb. 10.2.** Mathematische Gleichung zur Ermittlung der Zellzahl.

Da eine 1:2 Vorverdünnung der Zellsuspension angesetzt wurde, muss diese in die Formel mit einbezogen werden.

## **10.3 Zellulärer HDAC6-Inhibitions-Assay**

Bei der Durchführung der zellulären Inhibitions-Assays wurde durchweg Reinstwasser (Astacus Membran Pur, MembraPure GmbH, Bodenheim, Deutschland) verwendet und bis zum Schritt der Lyse (s. Kap. 10.3.2) unter sterilen Bedingungen (Sicherheitswerkbank) gearbeitet. Während die Antikörper I, entsprechend der Angabe in Klammern, mit 2 % Trockenmilch in TBS-T verdünnt (s. Kap. 10.5.5) und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert wurden, sollten die Verdünnungen der Antikörper II-Aliquote (4 µL) erst direkt vor dem Gebrauch hergestellt werden (s. Kap. 10.5.5).

### **10.3.1 Aussäen und Stimulation der Zellen mit den Testverbindungen**

Die Zellaussaat erfolgt in einer 6 Well Platte. Dabei werden zunächst die Zellen mittels Neubauer-Zählkammer (s. Kap. 10.2) gezählt und mit einer Dichte von 200.000 Zellen / mL in einem Gesamtvolumen von 5 mL ausgesät. Damit kann - trotz Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren - eine ausreichende Menge an Protein für die späteren Lysate gewährleistet werden. Nach der Aussaat werden die Zellen für circa 2 Std im Inkubator ruhen gelassen, bevor die Stimulation mit den Testsubstanzen erfolgen kann. In dieser Zeit werden die Stammlösungen mit PBS verdünnt (1:10, 1:100 oder 1:1000) und je nach gewünschter Endkonzentration zum Assay nach Ablauf der 2 Std zugegeben. In den meisten durchgeführten Testungen lagen die finalen Wirkstoffkonzentrationen der Testsubstanzen zwischen 200 und 500 nM, während diese für MS-275 (6) 5 µM betrug. Als Kontrolle diente eine DMSO-Lösung, deren Konzentration immer der maximal verwendeten Testsubstanzkonzentration entsprach. Die Stimulationszeit betrug 24 Std.

### **10.3.2 Durchführung der Ernte- und Lysevorgänge der Zellen**

Alle im Folgenden beschriebenen Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden vorsichtig resuspendiert, bevor sie aus der 6 Well Platte in beschriftete 15 mL Falcons überführt und die Wells mit je 1 mL PBS nachgewaschen wurden. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (2500 rpm, 5 min, 4 °C) und die Überstände entfernt. Die Pellets wurden in 1 mL PBS resuspendiert und in 1,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen überführt, erneut zentrifugiert (14000 rpm, 5 min, 4 °C) und die Überstände gründlich entfernt. Nach diesem Schritt besteht die Möglichkeit, die Zellpellets kurz in flüssigem Stickstoff schockartig einzufrieren, bei -80 °C zu lagern und zu einem späteren Zeitpunkt zu lysieren.

Für die Lyse wurden die Zellpellets je nach Pelletgröße mit circa 80-140 µL NET-N Lysepuffer resuspendiert, für 1,5 Std bei 0 °C geschüttelt und nach jeweils 30 min gevortext. Der NET-N Lysepuffer setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10 mM TRIS-HCl (pH = 8,0); 0,5 % Nonidet P 40; 10 % Glycerin; 1 Tablette (pro 10 mL Puffer) Protease-Inhibitor-Cocktail und 100 µL (pro 10 mL Puffer) Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 2.

Die Stammlösung des NET-N Lysepuffers kann bis auf den Bestandteil Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 2 vorab hergestellt und in Form von 1,5 mL-Aliquoten bei -20 °C gelagert werden. Der Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 2 (15 µL) wurde direkt vor dem Gebrauch zum aufgetauten Aliquot gegeben. Durch Zentrifugation (14000 rpm, 5 min, 4 °C) wurden die unlöslichen Zellbestandteile entfernt. Der Überstand wurde in ein frisches Mikrozentrifugenröhrchen (1,5 mL) überführt und bis zur Proteinbestimmung bei -80 °C gelagert.

### 10.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration pro µL Lysat erfolgte nach Bradford (s. **Tab. 10.2**).<sup>325</sup> Dafür wurden die Proben mit Reinstwasser 1:10 (5 µL Lysat+ 45 µL H<sub>2</sub>O) vorverdünnt und eine Standardverdünnungsreihe mit frischem bovinem Albumin erstellt (s. **Tab. 10.2**). Die Proteinbestimmung erfolgte in einer 96 Well Platte, wobei je 10 µL des vorpipettierten Standards sowie der Proben pro Well als Doppelbestimmung pipettiert wurden. Anschließend wurden 200 µL des Bradford-Reagenzes zu jeder Probe gegeben, die Platte mit Alufolie eingewickelt und sofort mittels Plattenlesegerätes bei 590 nm vermessen. Die Proteinkonzentration wurde mit der Software Microsoft Excel (Version 2013) berechnet.

	1 mg/mL Albumin [ $\mu$ L]	Reinstwasser	Proteinkonzentration [ $\mu$ g/mL]
Blank	0	30	0,0
S1	1,5	28,5	2,5
S2	3	27	5,0
S3	6	24	10,0
S4	9	21	15,0
S5	12	18	20,0
S6	15	15	25,0

**Tab. 10.2.** Pipettierschema der Standardkonzentrationsreihe vom bovinen Albumin

Das Bradford-Reagenz wurde hergestellt, indem zunächst der Farbstoff Blue G (s. **Tab. 10.3**) in Phosphorsäure gelöst wurde. Unter ständigem Rühren wurde portionsweise das Ethanol hinzugegeben und die Mischung mit Reinstwasser auf 500 mL aufgefüllt. Anschließend wurde der Puffer für 2 Std abgedunkelt gerührt und zweimal filtriert, um störende Schwebstoffe zu entfernen. Der Puffer sollte vor Gebrauch nicht geschüttelt werden, da der nicht vollständig aufgelöste Anteil des Farbstoffes aufgewirbelt wird. Direkt nach dem Ansetzen des Puffers weist dieser eine grünliche Farbe auf, die nach Einstellung eines stabilen pH-Wertes nach braun-rot umschlägt. Die Lagerung des Bradford-Reagenzes erfolgte bei 4 °C.

Chemikalien	Konzentration
Blue G	50 mg
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	50 mL
EtOH	25 mL
Reinstwasser	ad 500 mL

**Tab. 10.3.** Bestandteile des Bradford-Reagenzes.

### 10.3.4 Durchführung der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Herstellung der Gele

Nach erfolgter Messung am Plattenlesegerät wurde die Proteinmenge berechnet, und die Proben wurden ausgeglichen. Dabei wurde die Probe mit der geringsten Konzentration als Referenz gesetzt. Nach der Zugabe vom Probenpuffer nach Lämmli<sup>175</sup> (1:1 (v/v)) wurden die Proben für 5 min bei 95 °C erhitzt. Der kommerziell erworbene Probenpuffer nach Lämmli (Kap. 10.5.5) weist folgende Bestandteile auf (s. **Tab. 10.4**), die in Bezug auf die Elektrophorese unterschiedliche Funktionen ausüben:

Substanz	Funktion
Tris-HCl pH = 6,8	Puffer
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Denaturierung der Tertiärstruktur; Maskierung der Protein- Eigenladung
Glycerin	Absenkung der Probe in die Geltasche (aufgrund hoher Dichte)
DTT (Dithiothreitol)	Reduktion der Disulfidbrücken Denaturierung der Tertiärstruktur
Bromphenolblau	Farbkontrolle

**Tab. 10.4.** Die Funktion der einzelnen Bestandteile des Lämmli- Puffers.

Pro Gel sollten circa 30-40 µg Protein aufgeladen werden, um alle Proteine detektieren zu können. Einen Tag vor Gebrauch wurden die Gele (10 bzw. 12,5 % Trenngel, s. **Tab. 10.6**) gegossen und in feuchtem Zellstoff bei 4 °C gelagert. Zunächst wurden die Trenngele gegossen und mit <sup>i</sup>Prop. beschichtet. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde <sup>i</sup>Prop. gründlich ausgewaschen und das Sammelgel gegossen (s. **Tab. 10.7**). Am Tag der Durchführung der PAGE wurden die Kämme der Gele entfernt und die Taschen mit Reinstwasser ausgespült. Bei der Durchführung der Elektrophorese wurden die Proben zunächst mit 95 V in das Trenngel laufen gelassen, erst danach wurde die Spannung auf 125 V erhöht und mit dieser Einstellung für 1,5 Std entwickelt.

### 10.3.5 Western Blot

Die im Folgenden beschriebene Durchführung entspricht der von Beyer *et al.*<sup>174</sup> dokumentierten Vorgehensweise:

Bevor die Gele aus der Elektrophorese-Apparatur entnommen wurden, wurde zunächst pro Gel eine Immobilon-P Transfer Membran (Polyvinylidendifluorid (PVDF)) mit den Maßen 9 cm x 6 cm zugeschnitten, für 30 sek. in Ethanol äquilibriert und für 5-10 min im Blotpuffer (s. **Tab. 10.5**) befeuchtet. Anschließend wurden die Gele mit H<sub>2</sub>O gewaschen und bei 300 mA für 2 Std geblottet. Die Blotkammer wurde mit einem Kühllakku versehen.

Nach dem Blotvorgang wurde die Apparatur auseinander gebaut, die einzelnen Membranen für 5 min in TBS-T (*Tris-buffered saline with Tween 20*) gewaschen und für 1 Std bei Raumtemperatur mit einer 5 % Trockenmilch / TBS-T-Mischung blockiert. Nach dreimaligem Waschen (jeweils 5 min) mit TBS-T erfolgte die Inkubation der Membran mit den primären Antikörpern (HDAC6, ac-Tubulin, HSP 90 und ac-H3) rotierend bei 4 °C über Nacht. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T für jeweils 5 min wurden die Membranen mit den sekundären Antikörpern für 2 Std abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde für die Detektion von HDAC6 und ac-H3 der Licor IRDye 800 CW Esel Fluoreszenz Anti-Kaninchen IgG (H+L) Antikörper herangezogen, während für die Mausproteine HSP 90 und ac-Tubulin der Licor IRDye 800 CW Esel Fluoreszenz Anti-Maus IgG (H+L) Antikörper gewählt wurde.

Nach einem weiteren Waschvorgang (5 min) mit TBS-T wurde das Imaging der Membrane vorgenommen. Dabei erfolgte die Anregung bei 785 nm, während die Fluoreszenz bei 800 nm gemessen wurde. Mit Hilfe des Programms ImageStudioLite (Li-COR, Version 5.2.5, Lincoln, USA) konnten die Proteine über die zuvor genannten Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper detektiert werden. Der für die Detektion verwendete Fluoreszenzimager wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Seufert (Genetik, Institut für Biologie und Vorklinik, Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt. Bei den dargestellten Western Blots handelt es sich um repräsentative Abbildungen, wobei zu jedem Assay eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

### 10.3.6 Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

Sofern bei der Herstellung H<sub>2</sub>O verwendet wurde, handelte es sich stets um Reinstwasser.

Puffer, Lösungen oder Gele	Bestandteile	Zusatzinformation	Verwendung
1,0 M Tris-HCl pH= 6,8	60,57 g/ 500 mL Tris	Zur pH-Wert Einstellung: 6 N HCl <sub>aq</sub>	Sammelgel
1,5 M Tris-HCl pH= 8,8	90,86 g/ 500 mL Tris	Zur pH-Wert Einstellung: 6 N HCl <sub>aq</sub>	Trenngel
10 % APS	10 % Ammoniumpersulfat in Wasser	Lagerung bei -20 °C aliquotiert (200 µL)	Trenn-und Sammelgel
10 % SDS	10 % Sodiumdodecylsulfat in Wasser	Lagerung bei 0 °C	Trenn-und Sammelgel
Blockpuffer	5 % Trockenmilch in TBS-T	frische Herstellung	Western Blot
Blotpuffer	100 mL 5 x Lämmli Puffer 200 mL EtOH H <sub>2</sub> O ad 1000 mL	frische Herstellung	Western Blot
Elektrophorese Puffer	200 mL 5 x Lämmli Puffer 10 mL 10 % SDS H <sub>2</sub> O ad 1000 mL	frische Herstellung	SDS-PAGE
Lämmli Puffer 5 x Konzentration	250 mM Tris 1,92 M Glycin	Lagerung bei 4 °C	Pufferbestandteil
Puffer für Antikörper I+II	2 % Trockenmilch in TBS-T	Antikörper I: Lagerung bei 4 °C Antikörper II: frische Herstellung	Verdünnungslösung für die Antikörper
TBS (Tris gepufferte Salzlösung) 10 x Konzentration	200 mM Tris 1,4 M NaCl H <sub>2</sub> O ad 1000 mL	Lagerung bei 4 °C	Western Blot
TBS-T (Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20)	100 mL 10 x TBS 0,5 mL Tween 20 H <sub>2</sub> O ad 1000 mL	Lagerung bei 4 °C	Western Blot

**Tab. 10.5.** Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen. Hinweis auf die Hersteller in Kap. 10.5.5.

#### Bestandteile des Trenngels

Bestandteile	10%	12,50%
H <sub>2</sub> O	4,7 mL	3,9 mL
1,5 M Tris pH 8,8	3 mL	3 mL
10% SDS	120 µL	120 µL
Acrylamid	4 mL	4,8 mL
10% APS	100 µL	100 µL
TEMED	10 µL	10 µL

**Tab. 10.6.** Bestandteile des Trenngels.



### Bestandteil des Sammelgels

Bestandteile	Menge
H <sub>2</sub> O	4,2 mL
1,0 M Tris pH 6,8	760 µL
10% SDS	60 µL
Acrylamid	1000 µL
10% APS	90 µL
TEMED	9 µL

**Tab. 10.7.** Bestandteile des Sammelgels.

## 10.4 Bestimmung der Wasserlöslichkeit

Für die Bestimmung der Wasserlöslichkeit wurde zu 0,1 g Testsubstanz **13h** eine definierte Menge an H<sub>2</sub>O hinzugegeben (s. **Tab. 10.8**) und dabei das Volumen stufenweise erhöht, bis die Substanz vollständig gelöst ist. Nach jeder Zugabe an H<sub>2</sub>O, wurde die Mischung für 10 min geschüttelt und visuell hinsichtlich ungelöster Bestandteile geprüft. Die ungefähre Löslichkeit in g / L wurde entsprechend dem benötigten Volumen an H<sub>2</sub>O anhand der **Tab. 10.8** eingeordnet. Die Einordnung der Löslichkeit erfolgte sofort bei gut löslichen Substanzen, spätestens jedoch nach 96 Std für Substanzen mit geringer Wasserlöslichkeit.<sup>186</sup> Die Durchführung erfolgte bei Raumtemperatur (20 ± 0,5 °C) gemäß den Vorgaben der OECD-Richtlinie.<sup>186</sup>

Wassermenge [mL] für 0,1 g Testsubstanz <b>13h</b>	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
ungefähre Löslichkeit [g / L]	> 1000	200-1000	100-200	50-100	10-50	1-10	< 1

**Tab. 10.8.** OECD-Richtlinie zur Bestimmung der Wasserlöslichkeit.

## **10.5 Materialien und Methoden extern durchgeführter Untersuchungen**

Die in den nächsten Kapiteln dargestellten Methoden wurden von Mandy Beyer durchgeführt und werden hier nur der Vollständigkeit halber kurz beschrieben. Dabei beziehen sich die geschilderten Durchführungen auf die in Kap. 5.2.8-5.2.10 dargestellten Ergebnisse. Die im Zuge dieser Untersuchung gewonnenen Erkenntnisse stammen aus einer Doppelbestimmung.

### **10.5.1 Zellkulturbedingungen**

Die humanen Leukämie Zelllinien MV4-11, Jurkat, HEL und BV173 wurden für die Gewinnung von Zelllysaten in einer 6 Well Platte mit einer Dichte von 200.000 Zellen pro mL ausgesät. Für die Durchflusszytometrie erfolgte die Zellaussaat in einer 12 Well Platte, wobei die Zelldichte 150.000 Zellen / mL betrug. Nach der Aussaat erfolgte eine Adaptionszeit der Zellen für circa 2 Std, bevor mit der gewünschten Stimulation begonnen werden konnte. Die humane adhärente Zelllinie HEK293T wurde mit einer Dichte von 400.000 Zellen / mL in einer 6 Well Platte ausgesät und nach einer Adaptionszeit von 24 Std mit den entsprechenden HDAC6i stimuliert. Die Leukämie-Zelllinien wurden in einem RPMI 1640 Medium mit 10 % FBS und 1 % Penicillin / Streptomycin kultiviert. Die adhärente Zelllinie wurde in einem DMEM-Medium (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) mit 10 % FBS und 1 % Penicillin / Streptomycin kultiviert.

### **10.5.2 Isolierung der PBMCs**

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) wurden mit Hilfe des Ficoll Histopaque®-1077 (Polymere aus Saccharose (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)) über eine Dichtegradienten-Zentrifugation vom Leukozytenfilm (*buffy coat*) getrennt. Die Proben wurden von Blutspendern aus der Blutbank des Universitätsklinikum Mainz bezogen. PBMCs wurden dreimal mit einer Lösung aus PBS + 2 mM EDTA + 0,05 % BSA gewaschen und für die Durchflusszytometrie in einer 12 Well Platte mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen / mL ausgesät. Das Medium für die Kultivierung bestand aus: RPMI 1640 + 10 % FBS + 1 % Penicillin / Streptomycin.

### 10.5.3 Durchflusszytometrie

Die Zellzyklusverteilung wurde mit Propidiumiodid (PI, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) unter Zuhilfenahme der Durchflusszytometrie (FACS canto II) bestimmt. Die Zellen wurden mit 80 % EtOH bei -20 °C für mindestens 1 Std permeabilisiert und mittels freier RNase (1 µg pro Probe) für 1 Std bei Raumtemperatur versetzt, um die RNA, welche ebenfalls von PI angefärbt werden könnte, zu entfernen. Im Anschluss wurde PI zu jeder Probe gegeben und sofort mittels Durchflusszytometrie vermessen.

Zur Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose wurde eine Annexin / PI-Doppelfärbung durchgeführt: Zellen wurden zunächst für 30 min, auf Eis lagernd, mit Annexin V (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) angefärbt. Nach Zugabe von PI wurde sofort mittels Durchflusszytometrie gemessen. Als Kontrolle diente eine unbehandelte Zellprobe, welche in zwei Hälften geteilt wurde. Eine wurde mit Annexin V, die andere mit PI angefärbt. Die Kontrolle wurde mit einberechnet, um einerseits die Überlagerung und andererseits die Autofluoreszenz der beiden Farbstoffe zu kompensieren.

### 10.5.4 Transfektion

Zellen wurden mit den Plasmiden HDAC6 FLAG (# 13823, Addgene, Cambridge, England) und pcDNA3.1 als Leervektor transfiziert. 4 µL Turbofectamin (Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland) und 2 µg Plasmid wurden in 200 µL Gibco™ Opti-MEM® I Serum-Medium gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen für 48 Std mit dieser Mischung versetzt. Die Zellen wurden dann erneut ausgesät und nach einer Adaptionzeit von 24 Std mit 500 nM Marbostat-100 (**13a**) für 48 Std stimuliert. Im Anschluss wurde die SDS-PAGE durchgeführt (s. Kap. 10.3.4).

## 10.5.5 Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Antikörper

<b>Geräte/ Modellbezeichnung</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Firma</b>	<b>Verwendungszweck</b>
Autoklav 23, Typ 26		Melag Medizintechnik oHG Berlin, Deutschland	Sterilisation
Varioklav		HP Medizintechnik GmbH Oberschleißheim, Deutschland	Sterilisation
Gelelektrophorese- Apparatur/Western Blot Mini-Protean Tetra Handcast System		BioRad Laboratories GmbH München, Deutschland	Trennung der Proteine
Fluoreszenzimager Licor Odyssey Imager		LI-COR Biosciences GmbH Lincoln, USA	Detektion der Proteine
Hämozytometer Neubauer improved		Brand GmbH + CO KG Wertheim, Deutschland	Bestimmung der Zellzahl
Plattenlesegerät Spectra Fluor Plus Software: Xfluo r 4 V 4.40		Tecan GmbH Crailsheim, Deutschland	Bestimmung der Proteinmenge
Inkubator NU-5500 E		NuAire Laboratory Equipments Plymouth, USA	Zellkultivierung
Mikroskop CKX 41 SF		Olympus Europa SE & Co. KG Hamburg, Deutschland	Zellkultur
Sicherheitswerkbänke HERASafeKS		ThermoFisher Scientific Langenselbold Deutschland	Zellkultur
Zentrifuge Megafuge 1.0		Heraeus Holding GmbH Hanau, Deutschland	Zellkultur
Zentrifuge Sigma 1-14		Sigma Laborzentrifugen GmbH Osterode, Deutschland	Zellkultur
Zentrifuge B4i Multifunction		ThermoFisher Scientific Langenselbold Deutschland	Zellkultur
<b>Chemikalien, Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Firma</b>	<b>Verwendungszweck</b>
Blue G Triphenylmethan- farbstoff, Coomassie- Brillant-Blau G-250	27815	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland	Proteinbestimmung nach Bradford
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>		Merck KGaA Darmstadt, Deutschland Chemikalienausgabe, Universität Regensburg	Proteinbestimmung nach Bradford
EtOH, p.A.		Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland Chemikalienausgabe, Universität Regensburg	Proteinbestimmung nach Bradford, Puffer
Albumin Rinder-Serum Albumin (IgG free)	3737.1	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland	Proteinbestimmung nach Bradford

Acrylamid Rotiphorese NF- Acrylamide/ Bis Solution 30 %	A124.1	Carl Roth GmbH+ Co.KG Karlsruhe, Deutschland	Bestandteil des Gels
TEMED N,N,N',N' Tetraethylethylendiamin	T9281	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland	Bestandteil des Gels
TRIS Tris-(hydroxymethyl)- aminoethan	0188.1	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland	Bestandteil des Gels
SDS Sodiumdodecylsulfat	0183.3	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland	Bestandteil des Gels, Puffer
APS Ammoniumpersulfat	9592.3	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland	Bestandteil des Gels
EDTA Ethylendiamintetraessigsäure	8040.1	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland	NET-N Lysepuffer
Glycerin ≥99 %, für die Biochemie	3738.1	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland	NET-N Lysepuffer
NaCl	3957.3	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland	NET-N Lysepuffer, 10x TBS Puffer
Nonidet P 40 Substitut 4-Nonylphenyl- polyethylenglykol, BioXtra, Mischung aus 15 Homologen	74385	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland	NET-N Lysepuffer
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	P5726	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland	NET-N Lysepuffer
cOmplete™ Proteaseinhibitorcocktail Tabletten	4693116001	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland	NET-N Lysepuffer
Glycin ≥99%, für die Biochemie	3187.2	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland	5x Lämmli Puffer
Probenpuffer nach Lämmli 2x Konz.	11337	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland	2x Lämmli Puffer
Tween 20 Polyoxyethylen-20- sorbitanmonolaurat Polysorbat 20	9127.1	Carl Roth GmbH+ Co.KG Karlsruhe, Deutschland	TBS-T Puffer
RPMI 1640 Rosewell Park Memorial Institute	F1215	Biochrom GmbH Berlin, Deutschland	Zellkulturmedium
Glutamin	K0283	Biochrom GmbH Berlin, Deutschland	Zellkulturmedium
FBS Fetales Rinderserum ( <i>fetal bovines serum</i> ) FBS Superior Lot Nr. 1005B Lagerung bei -20 °C	S0615	Biochrom GmbH Berlin, Deutschland	Zellkulturmedium
PBS Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (w/o Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> )	D5652	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland	Zellkulturmedium

Penicillin und Streptomycin 1000 Einheiten/mL	A2212	Biochrom GmbH Berlin, Deutschland	Zellkulturmedium
DMSO Dimethylsulfoxid, $\geq 99,5$ % für Molekularbiologie	A994.1	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland	Zellkultur
Trypan Blau	T6146	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland	Zellkultur
Trypanblau-Lösung 0,4% /w/v) Trypan Blau in PBS, steril filtriert Lagerung bei 4 °C		eigene Herstellung	Zellkultur
6 Well Platten	657160	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland	Zellkultur
96 Well Platten	92696	TPP AG Trasadingen, Schweiz	Zellkultur
Kryoröhrchen; 2mL	722201	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland	Zellkultur
Mikrozentrifugenröhrchen; 1,5 mL konisch geformt hergestellt von Eppendorf	211-2130	VWR GmbH Darmstadt, Deutschland	Zellkultur
Pasteurpipetten (Glas) für Einmalgebrauch, 230 mm	612-3814	VWR GmbH Darmstadt, Deutschland	Zellkultur
Pipettenspitzen 10-200 $\mu$ L	70.760.002	Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland	Zellkultur
Pipettenspitzen 100-1000 $\mu$ L	70.762.100	Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland	Zellkultur
Pipettenspitzen 0,5-10 $\mu$ L Axygen™	12.555.537	ThermoFisher Scientific Langenselbold Deutschland	Zellkultur
Serologische Pipetten, für Einmalgebrauch 5/10/25 mL Cellstar®	606180/607180/76018 0	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland	Zellkultur
Sterilfilter; 0,2 $\mu$ m Minisart	17823	Sartorius AG Göttingen, Deutschland	Zellkultur
Zellkulturflaschen 25 oder 75 cm <sup>2</sup>	690160/658170	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland	Zellkultur
Zentrifugenröhrchen 15mL / 50 mL	188261/227261	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland	Zellkultur
Etinostat MS-275	BN0881	BioTrend Chemikalien GmbH Köln, Deutschland	Vergleichssubstanz
Panobinostat LBH 589	S1030	Selleckchem GmbH München, Deutschland	Vergleichssubstanz
Tubastatin A	S8049	Selleckchem GmbH München, Deutschland	Vergleichssubstanz
Trockenmilch/Milchpulver Blotting Grade, pulverisiert, fettarm	T145.2	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland	Western Blot

Blot-Membran Immobilion-P Transfer Membrane	IPVH00010	Merck Millipore Darmstadt, Deutschland	Western Blot
<b>Antikörper (Verdünnung mit 2% Trockenmilch in TBS-T)</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Firma</b>	<b>Verwendungszweck</b>
HDAC6 (1:1000) 160 kDa, monoklonaler Kaninchen Antikörper, D2E5	7558S	Cell Signaling Technology Frankfurt am Main, Deutschland	Antikörper I
HSP 90 (1:1000) 90 kDa, monoklonaler Maus Antikörper, AC88	ADI-SPA-830	Enzo Life Science, Inc. Lörrach, Deutschland	Antikörper I
acetyliertes $\alpha$ -Tubulin (1:2000) 55 kDa, monoklonaler Maus Antikörper	T7451	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland	Antikörper I
acetyliertes Histon 3 (1:1000) 15 kDa, monoklonaler Kaninchen Antikörper	06-599	Merck Millipore Darmstadt, Deutschland	Antikörper I
Licor IRDye 800 CW (1:10 000) Esel Fluoreszenz Anti- Kaninchen IgG (H+L) Antikörper	92532213	LiCor Biosciences Bad Homburg, Deutschland	Antikörper II
Licor IRDye 800 CW (1:10 000) Esel Fluoreszenz Anti- Maus IgG (H+L) Antikörper	92532212	LiCor Biosciences Bad Homburg, Deutschland	Antikörper II

**Tab. 10.9.** Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Antikörper für die zellulären Untersuchungen.

## 10.6 *In vitro*-Metabolisierungsstudie von 13h in humanen Lebermikrosomen

Die im weiteren Verlauf beschriebenen Methoden bzw. Durchführungen beruhen auf denen in der Dissertation von Dr. Zenger (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Heilmann, Lehrstuhl Pharmazeutische Biologie, Universität Regensburg) genannten Vorgehensweisen oder stellen Modifikationen dieser dar.

Die Aliquots der Testsubstanzen, sowie alle Cofaktoren wurden bei -20 °C, die Mikrosome bei -80 °C gelagert. Für die Herstellung der Puffer sowie zum Lösen der Testsubstanz, wurde ausschließlich Reinstwasser (Astacus Membran Pur, MembraPure GmbH, Bodenheim, Deutschland) verwendet.

### *In-vitro* Modell

Für die Metabolisierungsstudie wurden gepoolte humane Lebermikrosomen (HLMs) verschiedener Spender (50 Erwachsene) unterschiedlichen Geschlechtes von der Firma Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA) bezogen. Die HLMs wiesen eine Gesamtproteinkonzentration von 20 mg / mL auf. Sie wurden aliquotiert (25 µL) und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert, um häufiges Auf- und Einfrieren und damit einhergehende Aktivitätsverringern der Enzyme zu vermeiden.

### Bestandteile des Inkubationssystems bei Anwendung von Methode 1

#### Pufferlösung

- Kaliumphosphat-Puffer

Für die Herstellung des Kaliumphosphat-Puffers wurde zunächst eine Lösung A bestehend aus 2,76 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sowie eine Lösung B bestehend aus 4,56 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  in jeweils 100 mL Reinstwasser mit einer Endkonzentration von je 0,2 M angefertigt. 19,0 mL der Lösung A und 81,0 mL der Lösung B wurden vereinigt. Mit HCl wurde auf pH 7,4 eingestellt (pH-Meter). Der so eingestellte Puffer wurde 1:1 mit Reinstwasser verdünnt, um eine Endkonzentration von 0,1 M zu erhalten, daraufhin sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.



- Dulbecco's PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)-Puffer

Die Pufferlösung wurde kommerziell erworben (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) und beinhaltet laut Hersteller folgende Bestandteile:

Bestandteile	Mengenangabe in [g/L]
Kaliumchlorid	0,2
monobasisches Kaliumphosphat, anh.	0,2
Natriumchlorid	8,0
Dibasisches Natriumphosphat	1,15

**Tab. 10.10.** Bestandteile des Dulbecco PBS- Puffer.

#### Stocklösungen der Reagenzien

Glucose-6-phosphat (110 mM, **G-6-P**), Magnesiumchlorid hexahydrat (110 mM, **MgCl<sub>2</sub>**), Nicotinamadenindinucleotidphosphat (43 mM, **NADP**), reduziertes Nicotinamadenindinucleotidphosphat (10 mM, **NADPH**) und Uridin 5'-diphospho-glucuronsäure (40 mM, **UDPGA**) wurden, um die jeweilige in Klammern angegebene Endkonzentration zu erhalten, in der entsprechenden Menge Kaliumphosphat-Puffer gelöst. Aufgrund der kostspieligen Reagenzien und um etwaige Stabilitätsprobleme möglichst gering zu halten, wurde für die jeweiligen Stocklösungen ein Gesamtvolumen von 1 mL festgelegt. Davon abgewichen wurde nur, wenn aufgrund von zu geringen Einwaagen der resultierende Einwiegefehler nicht mehr tolerierbar gewesen wäre.

Zur Herstellung der Stocklösung von Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (**G-6-P-DH**) wurde diese mit einer 5 mM Natriumcitratlösung auf eine Konzentration von 40 U / mL verdünnt. Für die Stocklösung des porenbildenden Peptids Alamethicin (**Am**) wurde dieses in Methanol gelöst und mit Reinstwasser (2 %, v/v) auf eine Endkonzentration von 0,5 mg / mL eingestellt. Alle Reagenzien wurden aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

## Stocklösungen der Testsubstanzen

### 7-Ethoxycoumarin (7-EC)

Das als Positivkontrolle verwendete 7-EC wurde in Methanol gelöst (100 mM), mit Ethanol (1:4, 25 mM) verdünnt und bei 4 °C gelagert. Die Endkonzentration im Inkubationssystem betrug damit 250 µM.

### Testsubstanz **13h**

In Anlehnung an die Doktorarbeit von Dr. Zenger, wurde für die Vorbereitung der Stocklösung die Testsubstanz **13h** zunächst in DMSO (10 mM) gelöst und mit Ethanol (1:10) auf 1 mM verdünnt, sodass im Inkubationssystem eine Endkonzentration von 10 µM vorlag. Nachdem jedoch gezeigt werden konnte, dass DMSO die Stabilität der Testsubstanz **13h** beeinflusst (s. Kap. 6.3.2), wurde DMSO durch H<sub>2</sub>O ausgetauscht und die Verdünnung der Verbindung stets vor jedem Versuch frisch angesetzt, um Instabilitäten während der Lagerung auszuschließen. Die Stabilitätsprüfungen (s. Kap. 6.3.1, Kap. 6.3.2, Kap. 6.3.4) wurden in der höheren Testsubstanzkonzentration (100 µM) durchgeführt, um den maximalen Effekt zu sehen. Die Metabolisierungsstudie (s. Kap. 6.2) hingegen wurde mit 10 µM gestartet, da dies die in der Literatur<sup>326</sup> übliche Konzentration ist, und erst beim Ausbleiben von Metaboliten auf 100 µM erhöht.

## 10.6.1 Aufbau des Inkubationssystems bei Anwendung der Methode 1

Das Inkubationssystem wurde wie von Dr. Zenger beschrieben aufgebaut und entsprach damit der in der Literatur<sup>214,215</sup> gängigen Vorgehensweise. Das System setzt sich aus 7 verschiedenen Untereinheiten zusammen:

- 1) Durch ein NADPH-Regenerationssystem, bestehend aus MgCl<sub>2</sub> (3,3 mM), Glc-6-P (3,3 mM), Glc-6-P-DH (0,4 U/mL) und NADP (1,3 mM) wird die *in vitro*-Phase-I-Metabolisierung nachgeahmt.
- 2) Für die Phase II wird anstelle des NADPH-Regenerationssystems UDPGA (2 mM), sowie Alamethicin (25 µg / mL) zugegeben.
- 3) Phase I und II können auch nebeneinander vorliegend in einem System durch eine Co-Aktivierung der Phase I-Enzyme sowie der UGTs analysiert werden.

- 4) Negativkontrolle 1: Inkubationssystem ist aufgebaut, wie es für Phase I + II beschrieben wurde inklusive Testsubstanz, nur ohne Mikrosomenzugabe.
- 5) Negativkontrolle 2: Inkubationssystem ist aufgebaut, wie es für Phase I + II beschrieben wurde inklusive Testsubstanz, nur ohne Kofaktoren.
- 6) Negativkontrolle 3: Inkubationssystem ist aufgebaut, wie es für Phase I + II beschrieben wurde, allerdings ohne Testsubstanz.
- 7) Stabilitätsprüfung der Testsubstanz im Puffersystem ohne jegliche Reagenzien.

Die Inkubationssysteme 4-6 wurden zum Probenet hinzugenommen, um falsche Schlussfolgerungen aufgrund unspezifischer Reaktionen oder Instabilitätsproblemen zu minimieren.

#### Pipettierschema für Methode 1

Das hier dargestellte Schema ist aus der Dissertation von Dr. Zenger entnommen worden.

Inkubationssystem	PO <sub>4</sub> -Puffer	MgCl <sub>2</sub>	Glc-6-P	Glc-6-P-DH	Alamethicin	Mikrosome	Testsubstanz	NADP	UDPGA
Matrix	775	30	30	10	50	25	/	30	50
Stabilität	990	/	/	/	/	/	10	/	/
ohne Mikrosome	790	30	30	10	50	/	10	30	50
ohne Kofaktoren	845	30	30	10	50	25	10	/	/
Phase I	865	30	30	10	/	25	10	30	/
Phase II	835	30	/	/	50	25	10	/	50
Phase I+II	765	30	30	10	50	25	10	30	50

**Tab. 10.11.** Veranschaulichung des Pipettierschemas für Methode 1. Die Volumina sind in µL angegeben und beziehen sich auf ein Gesamtvolumen von 1 mL.

#### Durchführung der *in vitro*-Metabolisierung (Methode 1)

Alle Reagenzien wurden langsam aufgetaut und bis zum Start des Experiments auf Eis gelagert. Die Metabolisierungsstudie wurde in Eppendorf-Tubes (2 mL) durchgeführt, die zuvor mit vorgewärmten Kaliumphosphat-Puffer befüllt wurden. Dem Pipettierschema folgend, wurden die Reagenzien von links nach rechts hinzugegeben. Nach der Zugabe der Mikrosome wurde die Mischung vorsichtig gevortext und für 5 min im Wasserbad auf die Reaktionstemperatur (37 °C) gebracht.

Im Anschluss daran wurde die Testsubstanz zugegeben und die Mischung erneut gevortext. Durch die Zugabe von NADP und / oder UDPGA, je nach betrachteter Phase, wurde die Reaktion gestartet. Nach Übertragung der Eppendorf-Tubes in das vorgeheizte Wasserbad wurden sie unter ständigem Rühren für eine Std bzw. nach Modifikation der Methode für drei Std inkubiert. Die Reaktion der sieben beschriebenen Inkubationssysteme (**Tab. 10.11**) wurde bei allen zeitgleich gestartet, um Vergleichbarkeit gewährleisten zu können. Nach 60 bzw. 180 min wurde die Reaktion gestoppt, indem die einzelnen Reaktionsgemische in Eppendorf-Tubes überführt wurden, die ihrerseits die „Stopplösung“ enthielten. Die Proben wurden für 5 min gevortext und die präzipitierten Proteine durch Zentrifugation (14000 rpm, 5 min) entfernt. Der Überstand wurde entnommen und bis zur Durchführung der analytischen Methoden (HPLC bzw. LC-MS, ESI) bei -20 °C gelagert.

#### „Stopplösung“

In Anlehnung an die Arbeit von Dr. Zenger wurde im Falle des 7-EC die Reaktion mit einer 5 % (v/v) HCl-Lösung gestoppt. Das Verhältnis Reaktionsgemisch zur „Stopplösung“ betrug hierbei 1:5.

Im Fall der Testsubstanz **13h** wurde zunächst, den Angaben aus Lit.<sup>326</sup> folgend, die Reaktion mit einer eiskalten Methanol-Lösung beendet, wobei das Volumen der „Stopplösung“ dem des Reaktionsgemisches entsprach (1:1). Nachdem sich herausgestellt hatte, dass für die Testsubstanz **13h** Methanol als „Stopplösung“ ungeeignet ist, wurde dieses durch Ethanol ausgetauscht. Das Verhältnis (1:1) wurde beibehalten.

### **10.6.2 Durchführung und Aufbau des Inkubationssystems bei Anwendung der Methode 2**

Die für die Methode 1 hergestellten Stocklösungen wurden, sofern dies erforderlich war, dementsprechend verdünnt, sodass sie für Methode 2 verwendet werden konnten.

Der Aufbau der Methode 2 beruht auf Protokollen der Firma Thermo Fisher Scientific mit Ausnahme des verwendeten Puffers. Der von Thermo Fisher verwendete Phosphat-Puffer wurde gegen Dulbecco's PBS-Puffer ausgetauscht, um in dem Experiment Methode 1 (s. Kap. 10.6.1) vs. Methode 2 (s. Kap. 10.6.2)) prüfen zu können, ob die Stabilität des NADPHs einen Einfluss auf die Metabolisierung der Testsubstanz hat.

### Phase I-Metabolisierung:

Zunächst wird ein Reaktionsgemisch bestehend aus 183  $\mu\text{L}$  PBS-Puffer (0,1 M), 2  $\mu\text{L}$  Testsubstanz (1 mM) und 5  $\mu\text{L}$  Mikrosomen (Proteinkonzentration 20 mg / mL) 5 min im Wasserbad von 37 °C vorinkubiert, um zu gewährleisten, dass die genannten Bestandteile die optimale Inkubationstemperatur aufweisen, bevor 10  $\mu\text{L}$  NADPH (20 mM) zugegeben wurden.

### Phase I + II-Metabolisierung:

Zur Untersuchung der Phase I + II-Metabolisierung in einem System wurde das Inkubationssystem wie folgt aufgebaut:

Zu der in einem 1,5 mL Eppendorf Tube vorgelegten PBS-Puffer-Lösung (163  $\mu\text{L}$ , 100 mM) wurden 2  $\mu\text{L}$  der Testsubstanz (1 mM), 5  $\mu\text{L}$  der Mikrosome (0,5 mg/mL Proteinendkonzentration) sowie 20  $\mu\text{L}$  der UGT-Kofaktor-Lösung gegeben. Die UGT-Kofaktor-Lösung bestand aus UDPGA (50 mM), 500 mg Alamethicin / mg mikrosomales Protein und  $\text{MgCl}_2$  (10 mM). Zur Herstellung der jeweiligen Konzentrationen wurde der PBS-Puffer (100 mM, pH 7,4) verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde, wie bei der Phase I beschrieben, 5 min im temperierten Wasserbad (37 °C) vorinkubiert, bevor die Reaktion durch die Zugabe von 10  $\mu\text{L}$  NADPH (20 mM) gestartet wurde.

Die Phase I-, sowie Phase I + II-Reaktionen wurden nach 60 min durch die Zugabe von Ethanol (200  $\mu\text{L}$ ) gestoppt, das Gemisch gut mit der „Stopplösung“ durchmischt und anschließend zentrifugiert (3000 rpm, 5 min). Der Überstand wurde in frische Eppendorf-Tubes überführt und bis zur analytischen Vermessung bei -20 °C gelagert.

Wie für Methode 1 beschrieben, wurden, um Fehlinterpretationen zu vermeiden, parallel zu jedem Experiment Kontrollsysteme durchgeführt. Dabei handelt es sich zum einen um die Negativkontrolle, die ein Inkubationssystem ohne NADPH darstellt und für 60 min inkubiert wurde, und zum anderen um die „0 min“ Probe. Die „0 min“ Probe repräsentiert ein vollständiges Inkubationssystem, bei dem unmittelbar nach Zugabe von NADPH die Reaktion gestoppt wird. Sie ermöglicht es damit, bei einem Vergleich zwischen dieser und der Positivkontrolle (60 min + NADPH) das Ausmaß der Metabolisierung abschätzen zu können.

### 10.6.3 Analytische Methoden

#### Analytische HPLC-Methoden

Die Proben aus der Metabolisierungsstudie wurden einer analytischen HPLC-Messung unterzogen. Die Methode für 7-EC sowie seiner Metabolite wurde der Dissertation von Dr. Zenger entnommen.

Die **Tab. 10.12** zeigt die analytische HPLC-Methode für die Testsubstanz **13h**.

Zeit [min]	Flussrate [mL/min]	% A	% B
/	1,2	97	3
13	1,2	80	20
18	1,2	50	50
20	1,2	5	95
25	1,2	5	95
27	1,2	97	3
32	1,2	97	3

**Tab. 10.12.** Analytische HPLC-Methode für **13h**. Eluent A: H<sub>2</sub>O + 0,1 % Ameisensäure; Eluent B: 95 % Acetonitril+ 5 % H<sub>2</sub>O. Detektion bei 220 nm.

Die analytische HPLC-Messung des 7-EC sowie der Testsubstanz **13h** wurde auf einem System der Firma Waters GmbH (Eschborn, Deutschland) mit einer Waters 1525 Binary HPLC-Pumpe, einem Waters 2707 Autosampler und einem Waters 2998 UV-Vis-Detektor durchgeführt. Die verwendete Säule war eine Hibar 125-4, Purospher rp 18e, 3 µm der Firma Merck KGaA. Die Auswertung erfolgte mit der Software Empower 3, 2010 (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland). Das Injektionsvolumen für 7-EC betrug 10 µL, während es für die Testsubstanz bei 80 µL lag. Die Temperatur für den Säulenofen wurde auf 40 °C und die des Autosamplers auf 10 °C festgelegt.

#### Präparative HPLC-Methode

Vor der Durchführung der Metabolisierung wurde die Testsubstanz im größeren Maßstab präparativ von Simone Strauß (Arbeitsgruppe Prof. Dr. König, Institut Organische Chemie, Universität Regensburg) gereinigt. Diese Reinigung erfolgte an einem HPLC-Gerät der Firma Agilent Technologies (Serie 1100) mit einer G1361A-Pumpe, einem G1315B-UV-Vis-Detektor, einem G1329A-Autosampler sowie einem G1364A Fraktionskollektor. Die Messungen wurden mit einer Phenomenex Luna 10 µm C18 (250 x 21,2 mm) der Firma Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland) durchgeführt. Für die Auswertung wurde die

Software ChemStation for LC 3D Systeme der Firma Agilent Technologies herangezogen. Das Injektionsvolumen betrug 300 µL, und die Säulentemperatur lag bei 25 °C.

Zeit [min]	Flussrate [mL/min]	% A	% B
9	21	54	46
10	21	2	98
20	21	2	98

**Tab. 10.13.** Präparative HPLC-Methode für **13h**. Eluent A: H<sub>2</sub>O + 0,059 % [w/w] TFA; Eluent B: Acetonitril. Detektion bei 220 nm. Die Angaben wurden dem Protokoll von Simone Strauß (Arbeitsgruppe Prof. Dr. König, Universität Regensburg) entnommen.

#### Hochauflösende Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS, ESI)

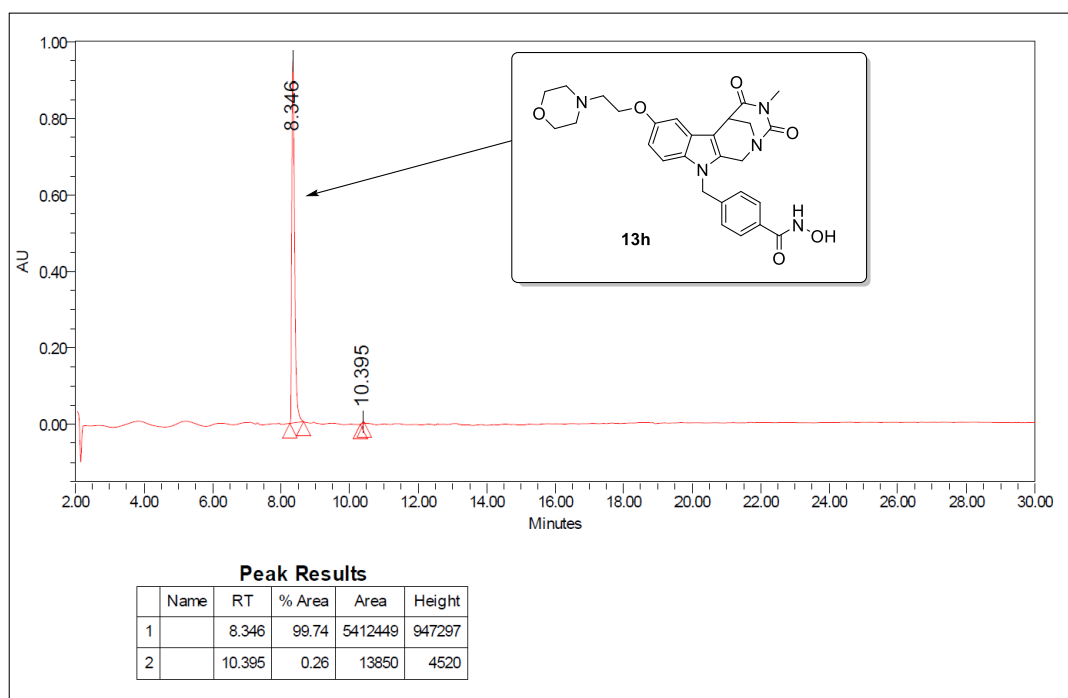
Die Messung aller Proben inklusive Negativkontrollen wurde von Josef Kiermaier (Abteilung für Massenspektrometrie der Fakultät der Chemie und Pharmazie, Universität Regensburg) durchgeführt. Diese erfolgte am UHPLC Agilent 1290 Infinity Gerät mit DAD G4212A, einem G4226A-Autosampler, einer G4220A-Pumpe, einem MS Agilent 6540 UHD Q-TOF sowie der positiv und negativen Elektrospray-Ionisation (ESI) unter Verwendung der dualen Ionenquelle. Für die Trennung wurde eine YMC-Triart Säule (C18, 1,9 µm, 12 nm, 75 x 2 mm) der Firma YMC Co. LTD. (Kyoto, Japan) verwendet. Das Injektionsvolumen für die Testsubstanz lag bei 0,5 µL, und die Säulentemperatur wurde auf 40 °C festgelegt. Die Integration der Peaks wurde automatisch von der Mass Hunter Software (B.05.00; Agilent Technologies) durchgeführt. Die Verbindungen aus der Datenbank (s. Kap. 10.6.5), sowie die Negativ- und Matrixkontrollen wurden mit den Proben verglichen und hinsichtlich der entsprechenden Massen der Metabolite untersucht.

Zeit [min]	Flussrate [mL/min]	% A	% B
0,5	0,6	100	0
5,5	0,6	2	98
6,5	0,6	2	98
6,6	0,6	100	0
8	0,6	100	0

**Tab. 10.14.** Gradientensystem zur Durchführung der LC-MS, ESI<sup>+/−</sup>-Messung für **13h**. Eluent A: H<sub>2</sub>O + 0,1 % Ameisensäure; Eluent B: Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure. Detektion bei 220 nm. Die Angaben wurden dem Protokoll von Josef Kiermaier entnommen.

### 10.6.4 Reinheitskontrolle der Testsubstanz

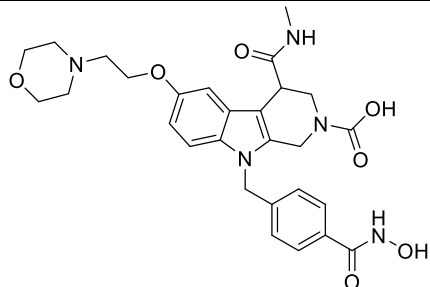
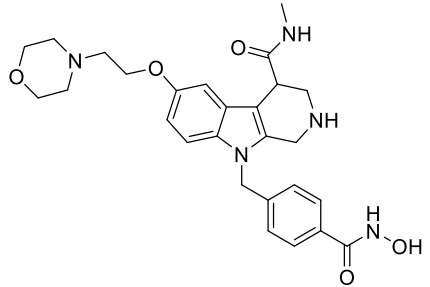
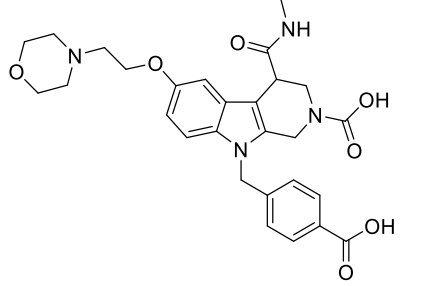
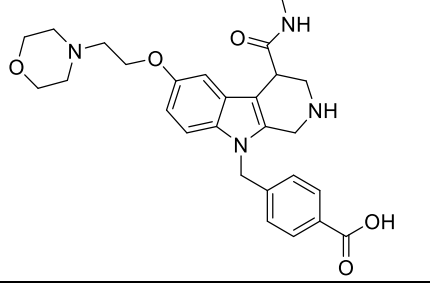
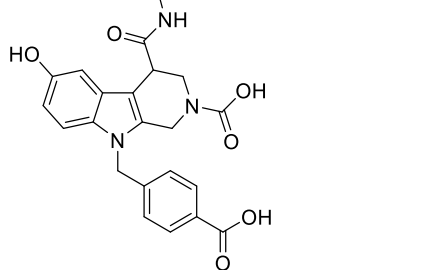
Die Prüfung der Reinheit mittels analytischer HPLC erfolgte nach der in Kap. 10.6.3 beschriebenen analytischen HPLC-Methode.

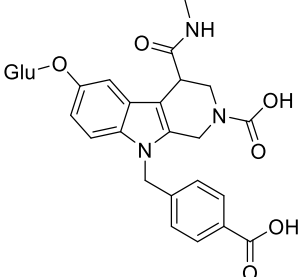
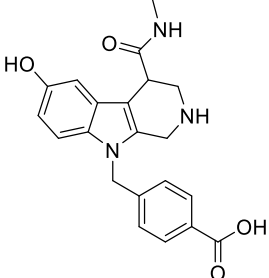
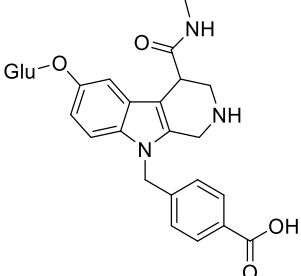
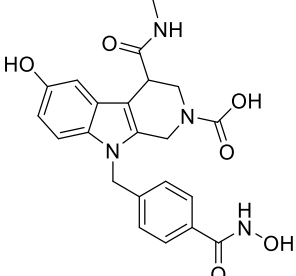
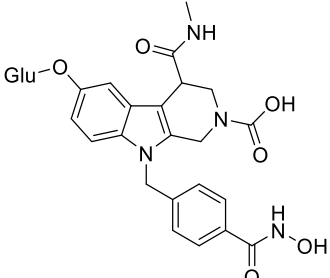
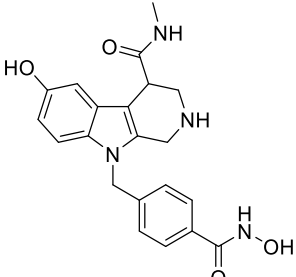


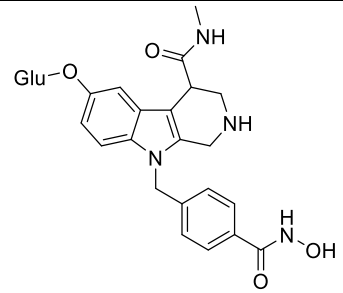
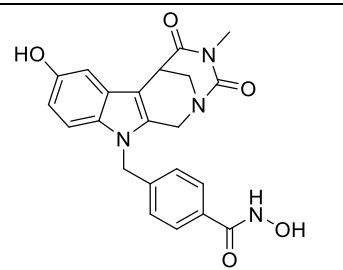
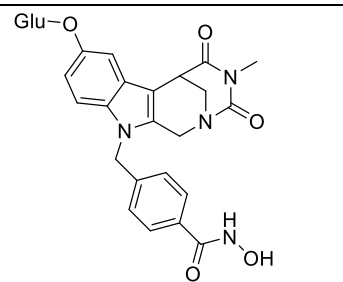
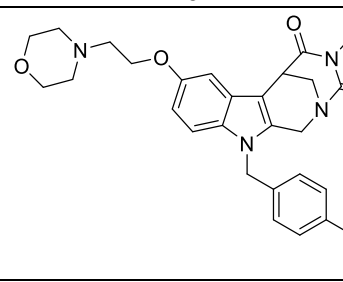
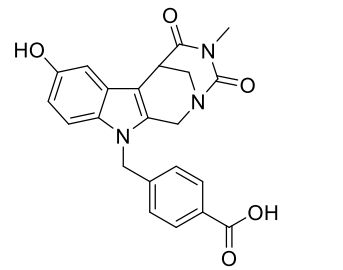
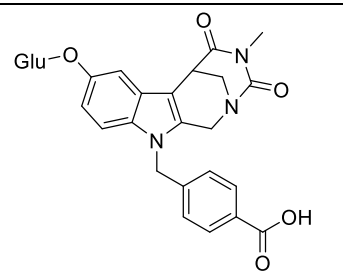
**Abb. 10.3.** Darstellung der analytischen Reinheit der Testsubstanz **13h**.



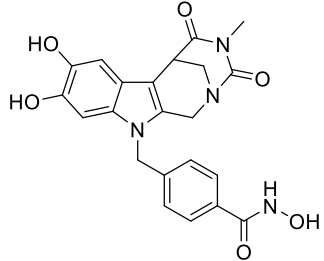
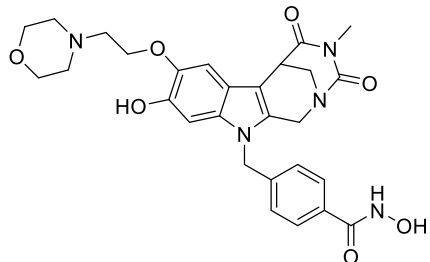
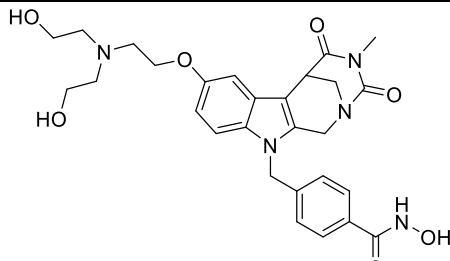
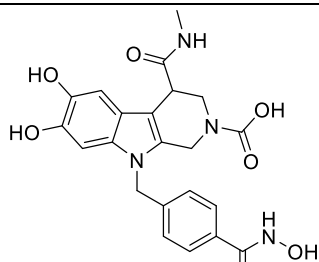
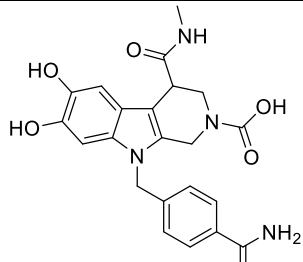
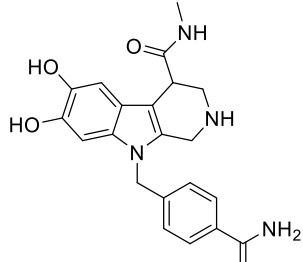
### 10.6.5 Überblick über die Verbindungen in der Datenbank für die Metabolisierungsstudie

Struktur	Molekulargewicht[g/mol]	Strukturformel
	551,2380	C <sub>28</sub> H <sub>33</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>
	507,2482	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>
	536,2271	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>
	492,2373	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>
	423,1430	C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>

	617,2820	$C_{28}H_{29}N_3O_{12}$
	379,1532	$C_{21}H_{21}N_3O_4$
	573,2932	$C_{27}H_{29}N_3O_{10}$
	438,1539	$C_{22}H_{22}N_4O_6$
	632,2929	$C_{28}H_{30}N_4O_{12}$
	394,1641	$C_{21}H_{22}N_4O_4$

	588,3041	$C_{27}H_{30}N_4O_{10}$
	420,1434	$C_{22}H_{20}N_4O_5$
	614,2834	$C_{28}H_{28}N_4O_{11}$
	518,2165	$C_{28}H_{30}N_4O_6$
	405,1325	$C_{22}H_{19}N_3O_5$
	599,2725	$C_{28}H_{27}N_3O_{11}$

	517,2325	$C_{28}H_{31}N_5O_5$
	535,2431	$C_{28}H_{33}N_5O_6$
	491,2533	$C_{27}H_{33}N_5O_4$
	422,1590	$C_{22}H_{22}N_4O_5$
	404,1485	$C_{22}H_{20}N_4O_4$
	420,1434	$C_{22}H_{20}N_4O_5$

	436,1383	C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>
	549,2223	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>
	551,2380	C <sub>28</sub> H <sub>33</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>
	454,1488	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>
	438,1539	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>
	394,1641	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>

**Tab. 10.15.** Überblick über die Verbindungen in der Datenbank für die Metabolisierungsstudie.

## 10.6.6 Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Antikörper

Geräte	Bestellnummer	Firma	Verwendungszweck
Gefriertrocknung	Seriennummer: 20020702	Piatkowski, Forschungsgeräte- Vertrieb München, Deutschland	Zur Gewinnung der Testsubstanz nach präparativer Auf- reinigung
Heizbad	Z404934	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	Durchführung der in vitro-Metabolisierung
pH-Meter	AL.16.L.O.1080 4 inoLab pH Level 1	WTW, Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co.KG Weilheim, Deutschland	ph-Wert Einstellung des Puffersystems
Vortexer-Schüttler	444-0007	VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland	Homogenisierung
Zentrifuge	Jouan BR4i multifunction	Thermo Fisher Scientific Massachusetts, USA	Abtrennung der Proteine
Chemikalien, Verbrauchsmaterialien	Bestellnummer	Firma	Verwendungszweck
Reinstwasser		Astacus Membrane Pure, MembraPure GmbH Bodenheim, Deutschland	Lösungsmittel und für die HPLC Analyse
Ameisensäure, hplc grade	1002642500	Merck Millipore, KGaA, Darmstadt, Deutschland	HPLC Analyse
Acetonitril, hplc grade	1.000.302.500	Merck Millipore, KGaA, Darmstadt, Deutschland	HPLC Analyse
Trifluoressigsäure, hplc grade	1082620100	Merck Millipore, KGaA, Darmstadt, Deutschland	HPLC Analyse
Dimethylsulfoxid, 99,7 %	BP 231-100	Fisher Scientific Company Pittsburgh, USA	Lösungsmittel für die Testsubstanzen
Kaliumdihydrogenphosphat	1048730250	Merck Millipore, KGaA, Darmstadt, Deutschland	Puffer
Dikaliumhydrogenphosphat	1051041000	Merck Millipore, KGaA, Darmstadt, Deutschland	Puffer
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	1058330250	Merck Millipore, KGaA, Darmstadt, Deutschland	Puffer
Dulbecco's Phosphat Puffer ohne Calcium und Magnesium	D8537	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	Puffer
Methanol hplc grade	106072500	Merck Millipore, KGaA, Darmstadt, Deutschland	„Stopplösung“ und für die HPLC Analyse

Ethanol, 99,8%	32205	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	„Stopplösung“
Salzsäure, 37%	20.252.420	VWR Chemicals GmbH Darmstadt, Deutschland	„Stopplösung“ für 7- EC, Einstellung des pH- Wertes
Eppendorf-Tubes; 2,0mL	30.120.094	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland	Ablauf der Reaktion
Eppendorf-Tubes; 1,5mL	30.120.086	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland	Ablauf der Reaktion
Mikrosomen; Human Pooled Donors	HMMCPL, 0,5 mL	Gibco/ ThermoFisher Scientific Massachusetts, USA	Metabolisierung
Alamethicin	A4665	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	Phase II & Phase I+II Metabolisierung
7-Ethoxycoumarin	E1379	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	Referenzsubstanz
UDPGA	U6751	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	Phase II & Phase I+II Metabolisierung
Glucose-6-phosphat	G7879	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	Phase I & Phase I + II Metabolisierung
Glucose-6-phosphat- Dehydrogenase, 100 UN	G6378	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	Phase I & Phase I + II Metabolisierung
NADP	N0505	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	Phase I & Phase I + II Metabolisierung
NADPH	AC 328742500	Acros Organics Geel, Belgien	Phase I & Phase I + II Metabolisierung
HPLC vials, 11mm, CRIMPSNAP-Vials, braun, 2mL	WIC 42730	Wicom Heppenheim, Deutschland	Aufbewahrungsort bis zur MS-Messung
Filter Perfect Flow RC 0,2 µm	WIC 80220	Wicom Heppenheim, Deutschland	Filtration des Überstandes

**Tab. 10.16.** Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Antikörper für die Metabolisierungsstudie.

## 10.7 *In vivo*- Testung von Marbostat-100 (13a), *R*-Marbostat-100 (*R*-13a) und 13h

Die im Folgenden beschriebenen Methoden bzw. Durchführungen basieren auf Protokollen der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Straub (Labor für Neuro-, Endokrino- und Immunologie, Abteilung für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg). Sämtliche Tierversuche wurden zusammen mit Dr. Hubert Stangl unter Anleitung und Aufsicht von Prof. Straub und gemäß den Vorgaben der Regierung von Unterfranken (Az 55.2 DMS-2532-2-124) durchgeführt. Für die tierschutzgerechte Durchführung der Tierversuche wurde der Felasa-B-Kurs absolviert (GWT mbH, München, Deutschland).

Lösungen oder Suspensionen, die an das Tier appliziert wurden, wurden stets unter sterilen Bedingungen angefertigt. Aliquots der Testsubstanzen wurden bei -20 °C gelagert, beim Transport zum Tierstall auf Eis gelagert und handwarm appliziert. Für alle biologischen Testungen wurde ausschließlich Reinstwasser (Astacus Membran Pur, MembraPure GmbH, Bodenheim, Deutschland) verwendet.

### 10.7.1 Arthritisinduktion, Scoreverteilung und Therapie

#### Versuchstiere

Die *in vivo*-Studien wurden in Kooperation mit Dr. Hubert Stangl (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Straub, Labor für Neuro-, Endokrino- und Immunologie, Abteilung für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg) durchgeführt. Dabei wurden männliche DBA/1J Mäuse im Alter von 6-8 Wochen von Elevage Janvier (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bezogen. Die Tiere wurden zu fünf in einem Käfig in den zentralen Tierlaboratorien des Universitätsklinikums Regensburg in spezifizierter pathogenfreier Umgebung gehalten, in dem Futter und H<sub>2</sub>O *ad libitum* zur Verfügung standen. Die Tiere wurden täglich einem 12-stündigen Tages-/Nacht-Zyklus ausgesetzt. Aufgrund des für die Mäuse stressigen Transportes wurden sie eine Woche lang an die Haltungsbedingungen gewöhnt, bevor die jeweiligen Versuche starteten. Im ersten Versuch wurden pro Gruppe (Vehikel, Marbostat-100 (**13a**) und Tubastatin A (**10**)) 15 Tiere untersucht, während es beim zweiten Versuch 10 Tiere pro Gruppe (Vehikel, **R-13a**, **13h**) waren. Die durchgeführten Experimente entsprachen alle den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes und wurden durch die Regierung der Oberpfalz gemäß den Regularien zur Durchführung tierexperimenteller Forschung genehmigt.<sup>57</sup> (AZ 55.2 DMS-2532-2-124)



### Arthritisinduktion bei den Versuchstieren, sowie Parametermessungen am Tag 0

Um im CIA-Modell die Arthritis auszulösen, erfolgte eine einmalige Injektion einer Suspension, bestehend aus gleichen Volumina bovinen Kollagens Typ II (MD Bioproducts, Egg bei Zürich, Schweiz) und kompletten Freund Adjuvans (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), die unter Zuhilfenahme eines Homogenisators (T10, Ultraturaxx, Ika Werke, Staufen, Deutschland) auf Eis emulgiert wurden. Die Suspension wurde stets frisch am Tag der Immunisierung hergestellt. Bei der Immunisierung befanden sich die Mäuse in einer luftdurchlässigen Kammer, die es gewährleistete, den Schwanz des Tieres zu fixieren. 100 µL der beschriebenen Suspension wurden jedem Tier intradermal in die Schwanzbasis injiziert. Ab dem Zeitpunkt der Immunisierung wurden täglich die Gelenke der Vorder- und Hinterpfoten hinsichtlich erster Arthritiszeichen (Schwellung und / oder Rötung) geprüft. Vor der Immunisierung wurde von jedem Tier das Startgewicht ermittelt. Bis zum Ausbruch der Erkrankung wurde alle 7 Tage das Gewicht bestimmt, ab dem Ausbruch täglich. Des Weiteren erfolgte am Tag der Arthritisinduktion die Nummerierung der Tiere anhand der Ohrlöcher (s. **Abb. 7.6**). Im ersten Versuch wurde zusätzlich nach Ausbruch der Arthritis täglich noch die Pfortendicke mit einem elektronischen Kaliper (Fa. Kroeplin, Schlüchtern, Deutschland) gemessen.

### Bewertung des Arthritis-Schweregrades mittels Score-System

Um den Krankheitsgrad und deren Progression greifbar zu machen, wurden die einzelnen Pfoten anhand von drei Kriterien (Rötung, Schwellung, Funktionseinschränkung) durch Vergabe von Punkten (Scores) eingeordnet. Bei der Punkteverteilung wurden die Vorder- und Hinterpfoten in drei Bereiche unterteilt: Zehen, Mittelhand / Mittelfuß und Sprunggelenk. Bei Betrachtung der Zehen wurde jede für sich bewertet und die Summe aus allen Zehen und Knöcheln ergab den Gesamtscore für das jeweilige Tier.<sup>57</sup>

<b>Arthritis-Score</b>	<b>klinische Symptome</b>
0,5	erste erkennbare Rötung, noch keine Schwellung
1,0	Rötung und sichtbare Schwellung
1,5	stärkere Rötung und stärkere Schwellung
2,0	starke Schwellung mit tieferer / violetter Färbung
2,5	Ekzeme im stark geschwollenen Bereich meist nur an Mittelfuß & Sprunggelenk sichtbar, selten

**Tab. 10.17.** Darstellung des klinisch-arthritischen Scores zur Bewertung des Krankheitsgrades.

Damit ergibt sich ein maximal erreichbarer Gesamtscore von 52 Punkten ( $4 \times \text{Pfoten} \times (4 \times 2,0 + 2,5 + 2,5)$ ). Da 2,5 Punkte selten vergeben werden, ist ein Gesamtscore von 48 pro Tier realistischer.

### Therapie

Zunächst wurden Stammlösungen der Testsubstanzen in reinem Dimethylsulfoxid (DMSO) erstellt. Diese wurden so mit Pharmasolve (20 % 1-Methyl-2-pyrrolidon, 5 % Cremophor EL und 75 % PBS) verdünnt, dass in einem Applikationsvolumen von 100 µL für Marbostat-100 (**13a**) eine Endkonzentration von 30 mg / kg und äquimolar für Tubastatin A (**10**) 24,9 mg / kg bzw. für **13h** 42,3 mg / kg vorlag. Das Endvolumen an DMSO in der Applikationslösung betrug bei allen Substanzen 5 %. Die Injektionslösungen wurden stets frisch und steril hergestellt und den Tieren, sobald das einzelne Tier in den Scorebereich 8-11 fiel, täglich gegen 8 Uhr intraperitoneal (i.p.) gespritzt (therapeutischer Behandlungsansatz).<sup>57</sup> Als Applikationslösung für die Vehikelgruppe diente eine sterile Pharmasolve-Lösung mit 5 % DMSO. Die Therapie wurde an 12-14 aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Am Tag 15 wurden alle Tiere mittels CO<sub>2</sub>-Begasung tierschutzgerecht getötet, die Hinterpfoten, Leber, Nieren und Milz entnommen bzw. abgetrennt und - bis zu deren Gebrauch für weitere Analysen - schockgefroren mit flüssigen N<sub>2</sub> und sachgemäß gelagert.<sup>57</sup>

### **10.7.2 Blutuntersuchungen**

Für die Analyse des Blutbildes wurde sofort Blut durch Herzpunktion am frisch getöteten Tier entnommen. Das Blut wurde in Kalium EDTA Monovetten (1,2 mL, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt und an das Universitätsklinikum Regensburg, Abteilung klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, zur Bestimmung der Hämoglobinkonzentration, der Leukozyten- und Erythrozytenanzahl weitergegeben. Dafür wurde ein voll automatisches Zählgerät eingesetzt, welches auch zur Untersuchung menschlicher Blutproben verwendet wird -

Für die Anti-Kollagen Typ II-Antikörperbestimmung wurde das Blut in Lithium Heparinröhrchen gesammelt und abzentrifugiert. Der Überstand, der das Blutplasma enthielt, wurde für die Messung weiterverwendet. Anti-Kollagen Typ II-Antikörper wurden mittels ELISA, einem quantitativen Immunoassay, bestimmt. Dafür wurde das verwendungsbereite bovine Maus Anti-Typ II Kollagen IgG Assay Kit der Firma Cayman Chemical Company verwendet. Die Messung wurde von Dr. Stangl anhand des Protokolls des Kit-Herstellers ausgeführt, nachdem die Blutplasmaproben 1:8000 vorverdünnt wurden.

### **10.7.3 Zytokinbestimmung**

Zur Zytokinbestimmung wurden am Ende des Versuches die Milzen aller Tiere entnommen und im eiskalten PBS aufbewahrt. Die Isolation der Milzzellen erfolgte durch Auseinandernehmen der Zellen über ein 70 µm Zellsieb mit RPMI 1640 Medium (RPMI 1640 + 10 % FCS, 1 % Penicillin / Streptomycin, 50 µM 2-Mercapto-ethanol, 2 % HEPES-Puffer und 0,01 % L-Ascorbinsäure) und Sammeln der Milz-Zellen in einem sterilen 50 mL Falcon. Die Zellzahl wurde bestimmt (s. Kap. 10.2) und auf 1 Mio. Zellen / mL Zellsuspension eingestellt. Zum Aussäen der Zellen auf einer 96 Well Platte (Corning Costar®, Sigma Aldrich, Deutschland) wurden 200 µL der Zellsuspension pro Well verwendet. Pro Tier und pro Bedingung (mit und ohne Concanavalin A) wurden mindestens 5 Wells angesetzt. Wie bereits in Kap. 7.9.1 beschrieben, wurde die Konzentration an IL-6 mit und ohne Concanavalin A (ConA-Stimulation) bestimmt. Für die Stimulation wurden die Zellen für 24 Std mit 5 µg/mL ConA versetzt. Nach 24 Std wurde zentrifugiert, der Überstand abgenommen

(ca. 200 µL) und auf neue sterile 96 Well Platten übertragen. Diese wurden bis zur Zytokinbestimmung mittels ELISA bei -20 °C weggefroren. Für die Bestimmung von IL-6 wurde das DuoSet ELISA Kit der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA) nach deren Protokoll angewendet. Die Durchführung wurde von Dr. Stangl übernommen.

### **10.7.4 Histologische Untersuchungen**

#### Aufarbeitung der Extremitäten

Direkt im Anschluss an die Blutabnahme wurden durch eine mittige Durchtrennung der Femora (Oberschenkelknochen) die Extremitäten abgetrennt, um die histologischen Untersuchungen durchführen und den histologisch-arthritischen Score ermitteln zu können. Die Gliedmaßen wurden nach links und rechts sortiert in einer neutral gepufferten 3,7 % Formalin-Lösung in einem 50 mL Falcon für 24 Std fixiert. Anschließend wurden die Proben mittels 14 % EDTA-Lösung für 2-3 Wochen bei RT. oder 4-8 °C rotierend entkalkt.

#### Bestandteile der EDTA-Lösung bezogen auf 1 L

EDTA	140 g
25 % NH <sub>3</sub>	90 mL
Reinstwasser	Ad 1 L
pH-Wert Einstellung auf 7,2	mit NaOH oder HCl

**Tab. 10.18.** Bestandteile der EDTA-Lösung.

2-3 mal pro Woche wurde die EDTA-Lösung ausgetauscht, und nach 1-2 Wochen wurden die Proben regelmäßig auf den Fortschritt der Entkalkung geprüft. Nach Entkalkung der Gliedmaßen wurden die Proben für 24 Std bei RT. oder 4-8 °C mittels 20-30 % Saccharose-Lösung (in PBS) entwässert.

Um die Pfoten einzubetten, wurden zunächst zylindrische Aluminiumförmchen (Rohlabo, Aluminium Rundlinge Typ R 80, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit einer Dicke von 30 µm und einem Zylinder von ca. 3 cm Höhe und 3 cm Durchmesser hergestellt. Diese Aluförmchen wurden ca. 1/2 bis 2/3 hoch mit Tissue Tek O.C.T Compound (wasserlösliche Glykole und Harze, Sakura Finetek, Leiden, Holland) befüllt. Es ist wichtig, eine luftblasenfreie Befüllung zu gewährleisten und die Probe vollständig zu bedecken, wobei Mittelfuß und Tibia horizontal am Boden liegen sollten, um anschließende laterale Schnitte zu ermöglichen. Die Aluformen werden dann mitsamt der Probe gleichmäßig von unten über flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren. Mit einem Gefriermikrotom (Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden 10 µm dicke Schnitte angefertigt und auf einem Objektträger (Superfrost plus, Menzel, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) durch elektrostatische Anziehung fixiert. Die Durchführung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Stangl.

Für die histologische Beurteilung arthritischer Symptome im Gelenk wurden mehrere Schnitte von beiden Hinterpfoten repräsentativer Tiere aus allen Gruppen (6 Hinterpfoten von je 3 Tieren pro Gruppe) mit DMMB angefärbt. Dieser Farbstoff färbt sulfatierte Glukosaminoglykangruppen (sGAG) im Knorpel an, je nach sGAG-Gehalt erscheint eine blaue (niedrig) bis violette (hoch) Färbung.<sup>295,327</sup> Den beiden Hinterpfoten jeder Maus wurden separat voneinander und verblindet Scores gegeben, wobei für jedes Tier ein Durchschnittsscore nach folgender Punkteverteilung (s. **Tab. 10.19**) ermittelt wurde, um die Schäden im Gelenk evaluieren zu können:

### Histoscore

Punkte	Schäden im Gelenk
0-4	Infiltration von Immunzellen in die Gelenkhöhle
0-4	Infiltration von Immunzellen in benachbartes Gewebe
0-4	Knochenerosion & Entzündung des Periosteums (Knochenhaut)
0-4	Knochenerosion subchondral & artikulär
0-4	Knorpelabbau

**Tab. 10.19.** Histoscores zur Bewertung des Krankheitsgrades.

Damit ergibt sich ein maximaler histologisch-arthritischer Score von 20.<sup>57</sup>

### DMMB Färbung

Herstellung einer 0,1 % 1,9-Dimethylmethylenblau (DMMB)-Lösung

DMMB	0,1 g
Millipore H <sub>2</sub> O	100 mL

**Tab. 10.20.** Bestandteile der DMMB-Lösung.

### Durchführung des Färbevorganges nach Protokollvorschriften vom Arbeitskreis Prof. Dr. Straub

- 1) Tissue Tek O.C.T Compound wird durch Inkubation der Schnitte mit dest. H<sub>2</sub>O entfernt
- 2) Die Schnitte vorsichtig für 2-5 min in die DMMB-Lösung eintauchen
- 3) 2 min mit H<sub>2</sub>O waschen
- 4) Entwässern durch Eintauchen in aufsteigender Alkoholreihe : 50 % EtOH -> 70 % EtOH -> 90 % EtOH -> 95 % EtOH -> 99.9 % EtOH, jeweils 3 min pro Lösung
- 5) Behandlung mit Xylolersatz (fungiert als Intermedium und verdrängt den Alkohol)
- 6) Die entwässerte Probe wird mit einem nichtwässrigen Eindeckmittel und einem Deckglas abgedeckt. Durch das wasserfreie Eindeckmittel wird die Probe geschützt und eine optimale Färbung sichergestellt.

### 10.7.5 Micro-Computertomographie - Messungen zur Analyse der morphometrischen Knochenparameter

Alle Messungen wurden von Dr. Birgit Striegl (Technische Hochschule (OTH), Fakultät Maschinenbau, Regensburg, Deutschland) am Röntgenprüfsystem v|tome|x s 240/180 Research Edition, der Firma GE Sensing & Inspection Technologies GmbH durchgeführt. Die Geräteeinstellungen zur Durchführung der Scans wurden wie folgt gewählt: 30 kV Spannung, 230 mA Strom, 500 ms Belichtungszeit pro Schnittbild, 800 Schnittbilder, 20 µm Voxelgröße bei Hinterpfoten und 10 µm Voxelgröße beim Knie, 10 x Vergrößerung (Hinterpfote) und 20 x Vergrößerung (Knie). Gemessen wurden die zuvor in 3,7 % Formaldehyd-Lösung (s. Kap. 10.7.4) fixierten Kniegelenke und die beiden Hinterpfoten der CIA-Mäuse (10 Tiere pro Gruppe). Bei der Analyse der Hinterpfoten, die die meisten Erosionen zeigten, wurden zusätzlich auch noch die beiden Hinterpfoten gleichaltriger gesunder Mäuse als Kontrolltiere (5 Tiere) vermessen. Die rekonstruierten Volumina wurden mit der entsprechenden Herstellersoftware phoenix datos|x 2 reconstruction 2.4.0 verarbeitet, während für die Messung der morphometrischen Parameter die Software Volume Graphics VG Studio Max 2.2.3 verwendet wurde.

Da die Messung der Knie keine signifikanten arthritischen Zeichen aufwies, wurde auf die Bestimmung der morphometrischen Parameter, wie Trabeldicke, Trabekelanzahl etc. verzichtet. Deren Bestimmung in den Hinterpfoten ist nicht möglich. Daher wurden bei jeder Pfote das BS / BV-Verhältnis (Knochenoberfläche zu Knochenvolumen), welches ein Indikator für die Knochenerosionen ist, im ROI (*region of interest*) berechnet. Die BS / BV-Werte konnten als Vergleichsparameter herangezogen werden, da diese Werte auf 1 mm bezogen wurden, wodurch diese einen relativen Wert darstellen und somit unabhängig von der genauen ROI-Größe sind. Da es sich um biologische Proben handelt können sich trotz gleicher Einstellungen die Volumina der ROIs geringfügig voneinander unterscheiden.

Das ROI wurde folgendermaßen festgelegt:

Das Gelenk des Mittelzehs wurde als Start gewählt, davon ausgehend  $1,00 \pm 0,05$  mm distal (nach oben Richtung Zehenspitzen) und  $2,20 \pm 0,05$  mm proximal (Richtung Sprunggelenk). Das ROI wurde insgesamt über die mittleren drei Zehen gelegt. Die Einstellung für die ROI-Parameter im Arthritis-Modell erfolgte anhand von Daten aus der Literatur,<sup>328,329</sup> sowie anhand von Erfahrungswerten von Dr. Birgit Striegl. Bei den ROIs für die Kniemessung

wurde ausgehend von 0,50 mm distal bis zur Wachstumsplatte einer jeden Tibia (Schienbein) gemessen.

### **10.7.6 Statistische Auswertung der *in vivo*-Mausstudie**

Die Resultate wurden in Form von Boxplots mit 10 % (Minimum), 25 % (unteres Quantil), 50 % (Median), 75 % (oberes Quantil) und 90 % (Maximum)-Quantilen präsentiert. Nur die Ergebnisse der klinisch-arthritischen Scores, der Körpergewichte, sowie die der Pfotendicke wurden aufgrund des großen Datensatzes zur Übersichtlichkeit als Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben. Bei einem Vergleich von zwei Gruppen wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test angewendet, während bei einem Medianvergleich mehrerer Gruppen der two-way-ANOVA Test (Holm Sidak Methode) herangezogen wurde (Sigma Plot, Version 11, Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland).<sup>57</sup> Als statistisch signifikant wurden p-Werte unter 0,05 angenommen. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm Prism 6 (Graph Pad Inc., La Jolla, USA) verwendet. Ausreißer - wenn vorhanden - wurden vollständig in sämtlichen Gruppen über / unter den Ausreißergrenzen (Mittelwert  $\pm 2 \times$  Standardabweichung) entfernt (s. **Abb. 7.17**). Die statistische Auswertung wurde von Dr. Hubert Stangl im Rahmen unserer Kooperation übernommen.

## 10.7.7 Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Kits

Geräte	Bestell-nummer	Firma	Verwendungs-zweck
micro RöntgenCT, V tome xs240 180 Research Edition	NDT01KS004 -258214	GE Sensing& Inspection Technologies GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland	histologische Untersuchungen
Gefriermikrotom	CM3050S	Leica, Wetzlar, Deutschland	histologische Untersuchungen
Ultraturaxx T10	3737000	Ika Werke, Staufen, Deutschland	Immunisierung
elektronisch, externer Kaliper	C110	Kröplin, Schlüchtern, Deutschland	Messung der Pfortendicke
Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Kits	Bestell-nummer	Firma	Verwendungs-zweck
1,9 Dimethylmethylenblau	341088	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	histologische Untersuchungen
Tissue Tek O.C.T Compound	4583	Sakura Finetek, Leiden, Holland	histologische Untersuchungen
Xylolersatz "Roti-Histol"	6640.2	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	histologische Untersuchungen
Eindeckmittel "Entellan NEU"	1079610100	Merck Millipore, KGaA, Darmstadt, Deutschland	histologische Untersuchungen
EDTA	ED-1kg	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	histologische Untersuchungen
Ammoniaklösung, 25 %	1054222500	Merck Millipore, KGaA, Darmstadt, Deutschland	histologische Untersuchungen
Formaldehyd-Lösung, 37 %	8187081000	Merck Millipore, KGaA, Darmstadt, Deutschland	histologische Untersuchungen
Objektträger Superfrost plus, Menzel	J1800AMNZ	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA	histologische Untersuchungen
Aluminiumförmchen, Rotilabo®- Aluminium-Rundlinge Typ R80	E723.1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	histologische Untersuchungen
RPMI 1640 Zellkulturmedium	D8558	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	Milzzellkultur
Zellsieb 70µm, easy strainer	542070	Greiner, Kremsmünster, Österreich	Milzzellkultur
96 Well Platten Corning Costar®	3598	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	Milzzellkultur, Zytokin- bestimmung
Concanavalin A	C7275	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	Milzzellkultur, Stimulation
Mouse IL-6 ELISA Kit	DY406	R&D Systems, Minnesota, USA	Milzzellkultur, Zytokin- bestimmung
Fetales Kälber Serum (FCS) hitzeinaktiviert	F0804	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	Milzzellkultur (Endkonz. 10 % V/V)
HEPES Puffer	H0887	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	Milzzellkultur (Endkonz. 2 % V/V)



L-Ascorbinsäure	A4034	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	Milzzellkultur (Endkonz. 0.01 % m/V)
β-Mercapto-ethanol	M-6250	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	Milzzellkultur (Endkonz. 50µM)
Penicillin/Streptomycin lösung	P0781	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	Milzzellkultur (Endkonz. 1 % V/V)
Mouse Anti Kollagen II IgG ELISA kit	500410	Cayman Chemicals Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland	Anti Collagen AK Bestimmung
Lithium-Heparin Röhrchen 1.3 mL	411393005	Sarstedt, Kleinstadt, Deutschland	Anti-Collagen-II AK Bestimmung
Phosphatgepufferte Salzlösung, PBS	D8537	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	Injektion
DMSO	D2650	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	Injektion
1-Methyl-2-pyrrolidinon	494496	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	Injektion
Cremophor EL	C5135	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	Injektion
EDTA Monovetten 1,2 mL	61664001	Sarstedt, Kleinstadt, Deutschland	Blutbildbestimmung
bovines Kollagen Typ II	804001-sol	MD Bioproducts, Zürich, Schweiz	Immunisierung
komplettes Freund Adjuvans	F5881	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	Immunisierung

**Tab. 10.21.** Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Kits für die Mausstudie.

# **Kapitel 11**

## **Anhang**

## 11 Anhang

### 11.1 Übersicht über die $^1\text{H}$ -NMR-Spektren

#### 11.1.1 Allgemeine Angaben

Im Folgenden werden die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren, der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Endverbindungen gezeigt. Bei der Leitverbindung Marbostat-100 (**13a**) werden zusätzlich noch die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren aller Zwischenstufen abgebildet. Die Auswertung der Spektren erfolgte mittels des Programms MestReNova 10.0 (Mestrelab Research, Compostela, Spanien).

#### 11.1.2 Darstellung der $^1\text{H}$ -NMR-Spektren

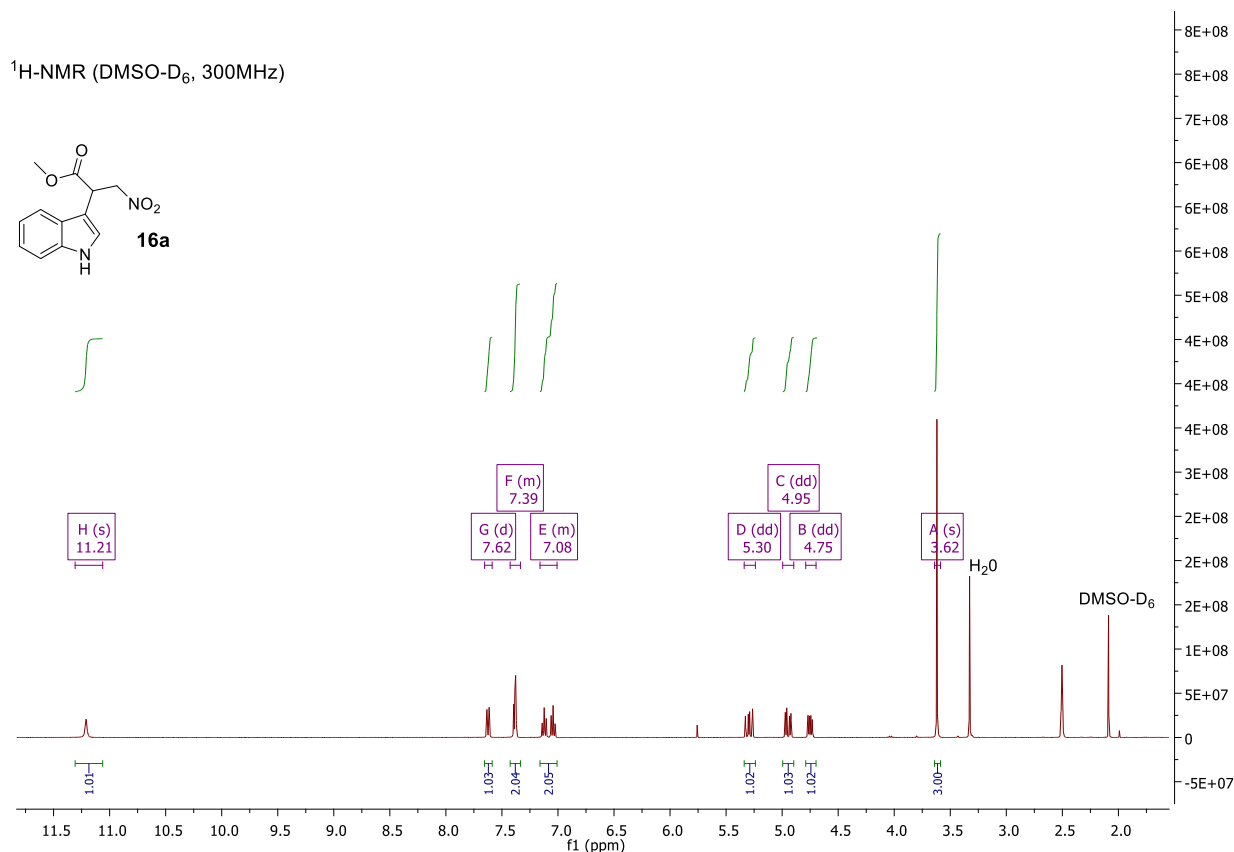
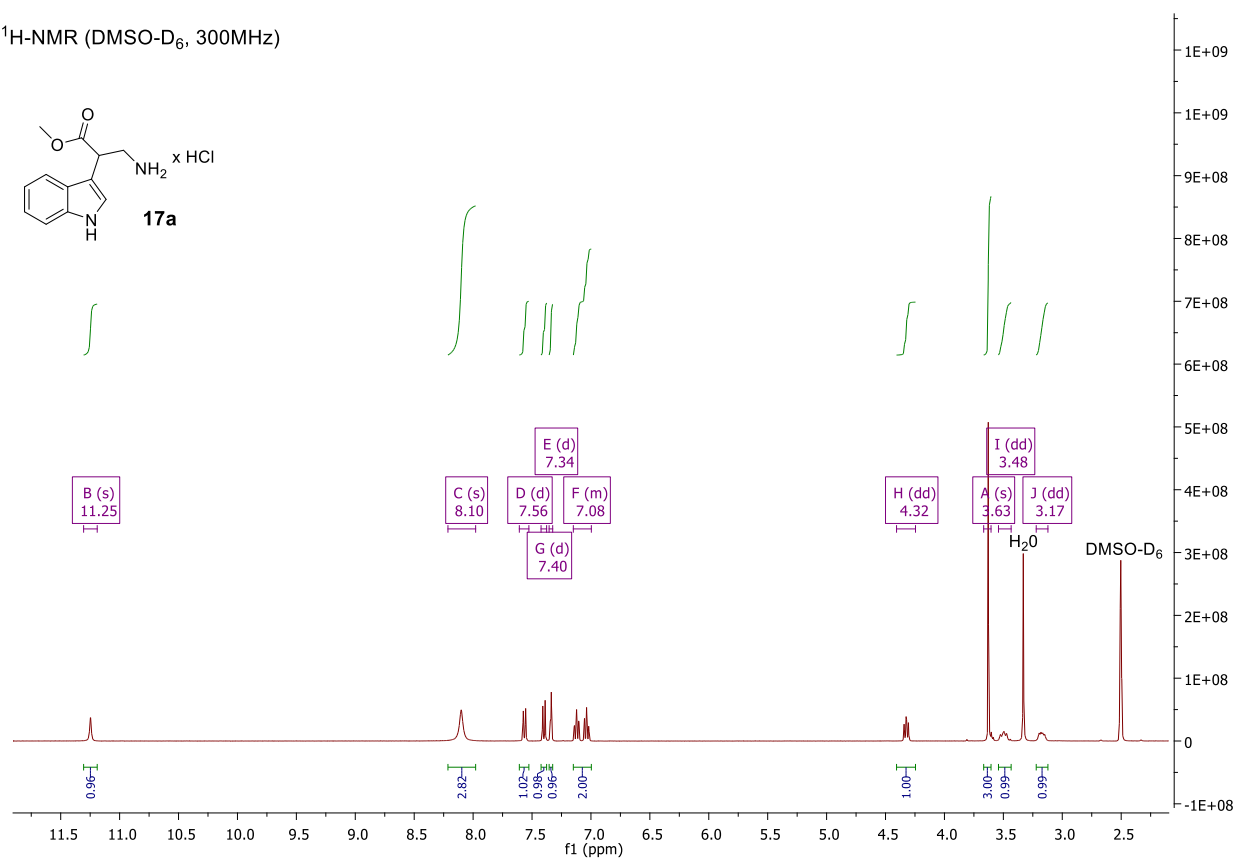
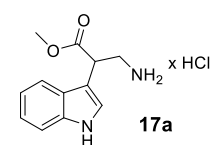


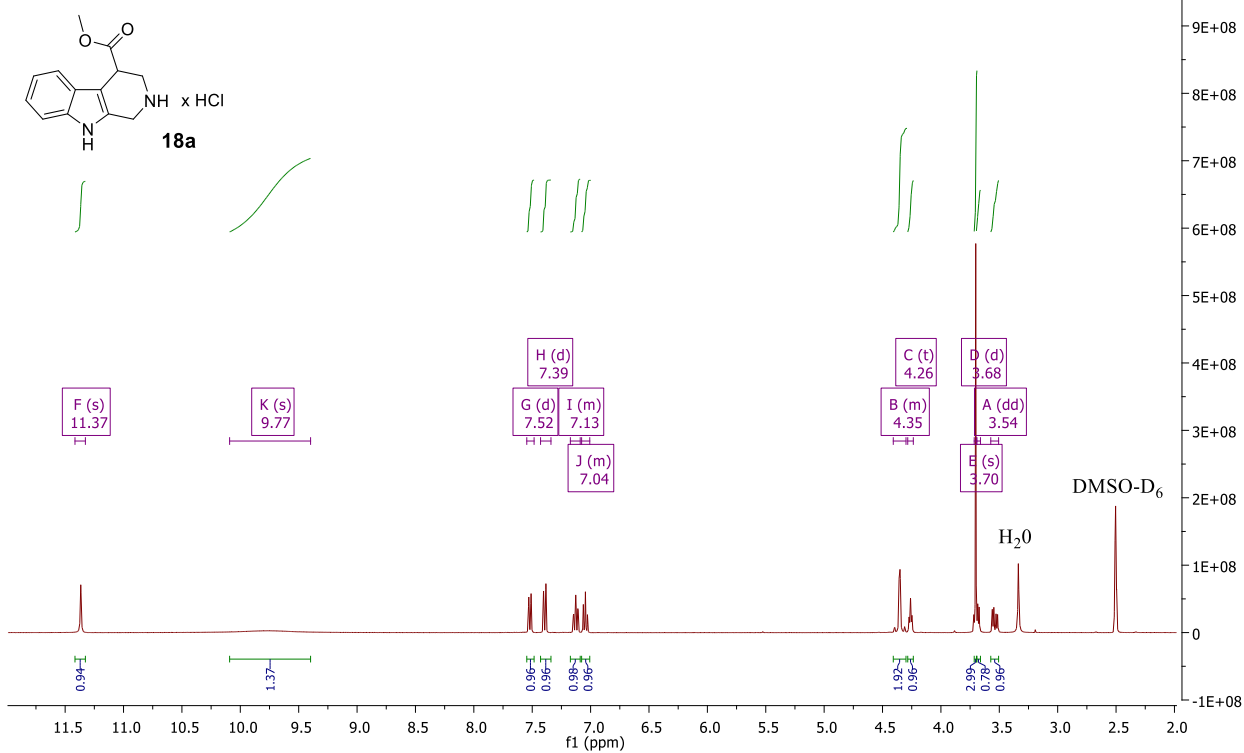
Abb. A.1. Darstellung des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von **16a**.

$^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $\text{D}_6$ , 300MHz)



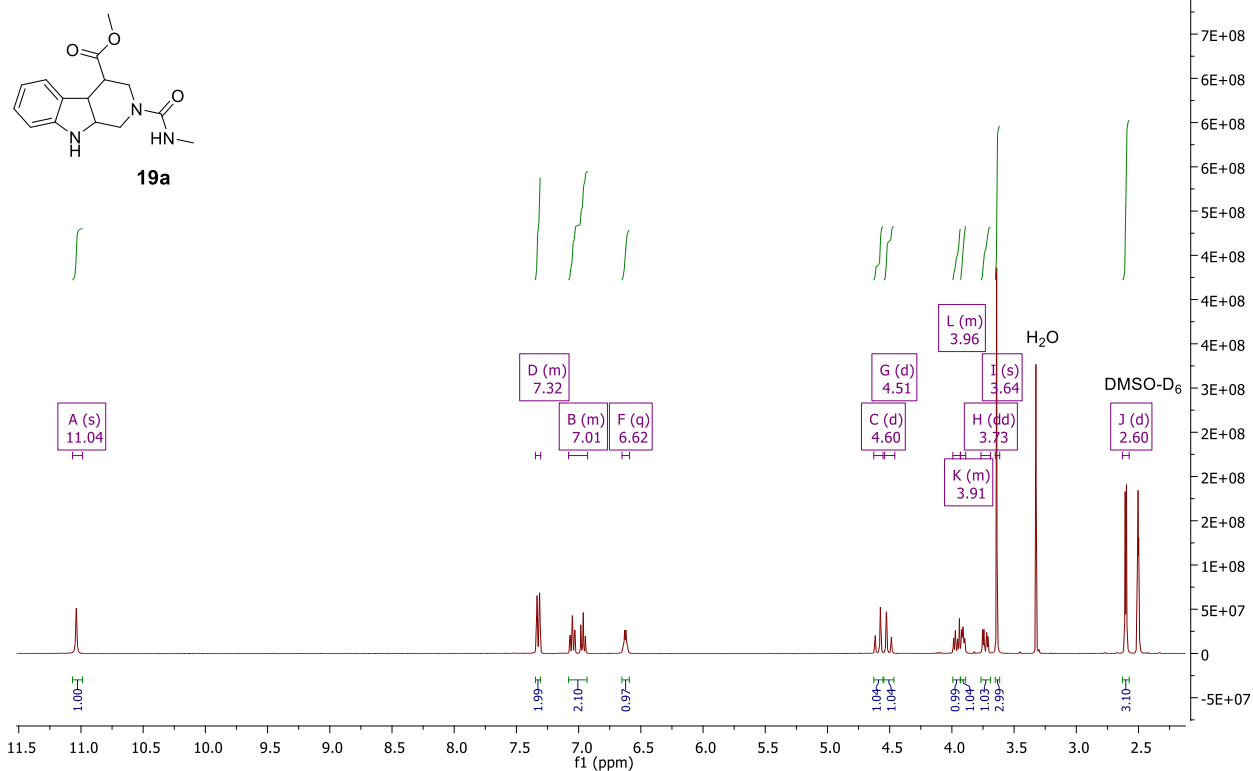
**Abb. A.2.** Darstellung des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von **17a**.

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $\text{D}_6$ , 300MHz)



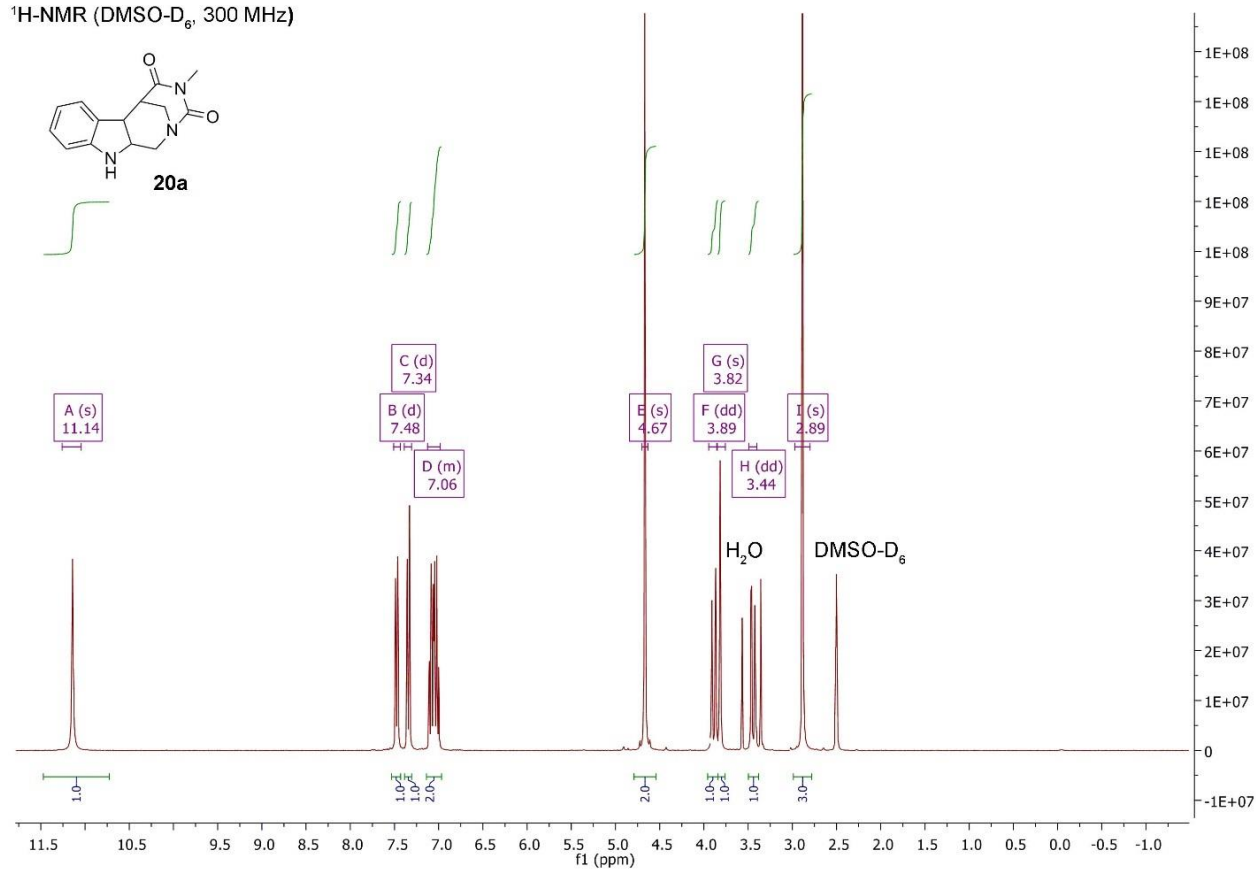
**Abb. A.3.** Darstellung des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von **18a**.

$^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $\text{D}_6$ , 300 MHz)



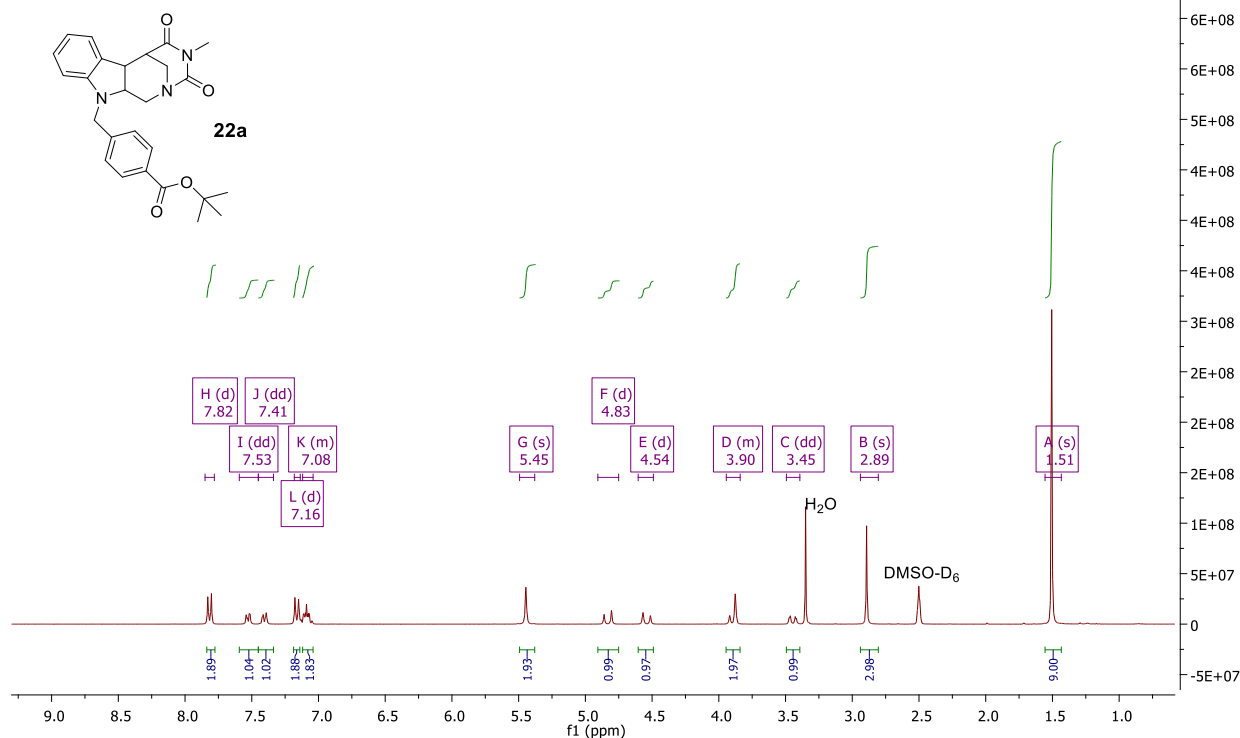
**Abb. A.4.** Darstellung des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von **19a**.

$^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $\text{D}_6$ , 300 MHz)



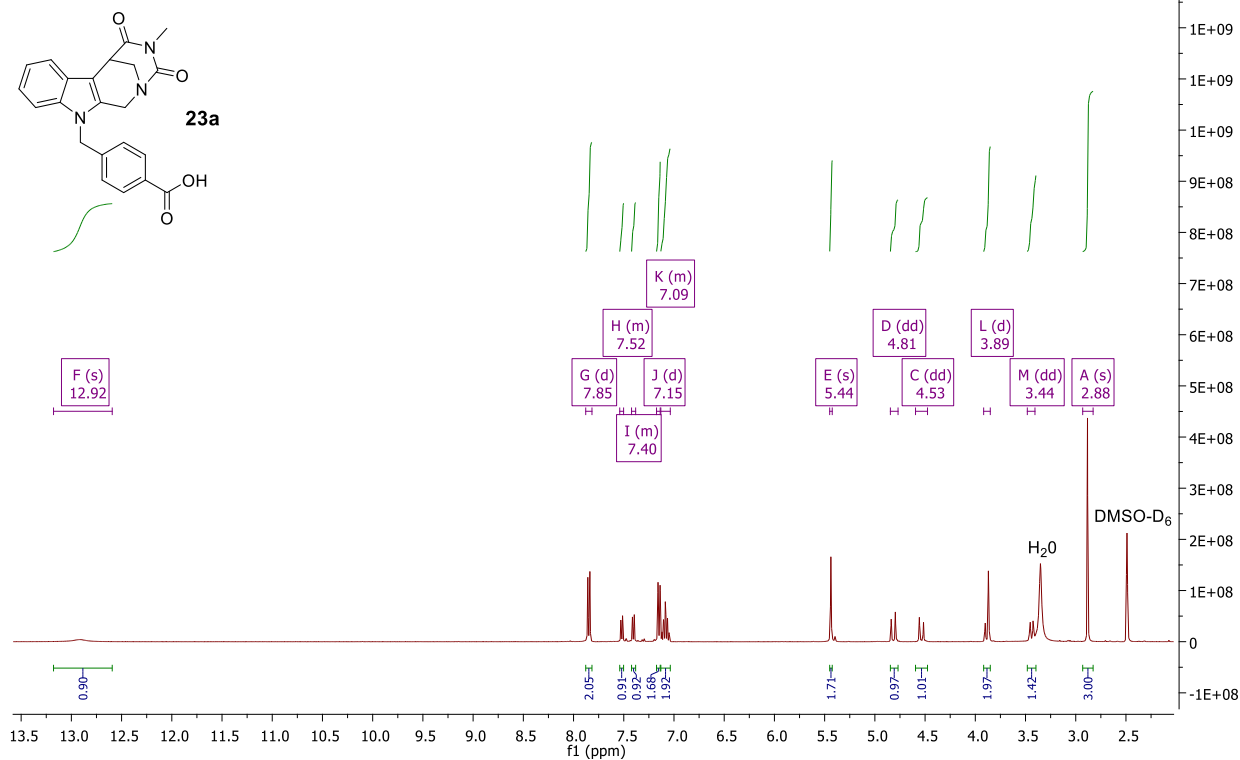
**Abb. A.5.** Darstellung des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von **20a**.

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $\text{D}_6$ , 300 MHz)

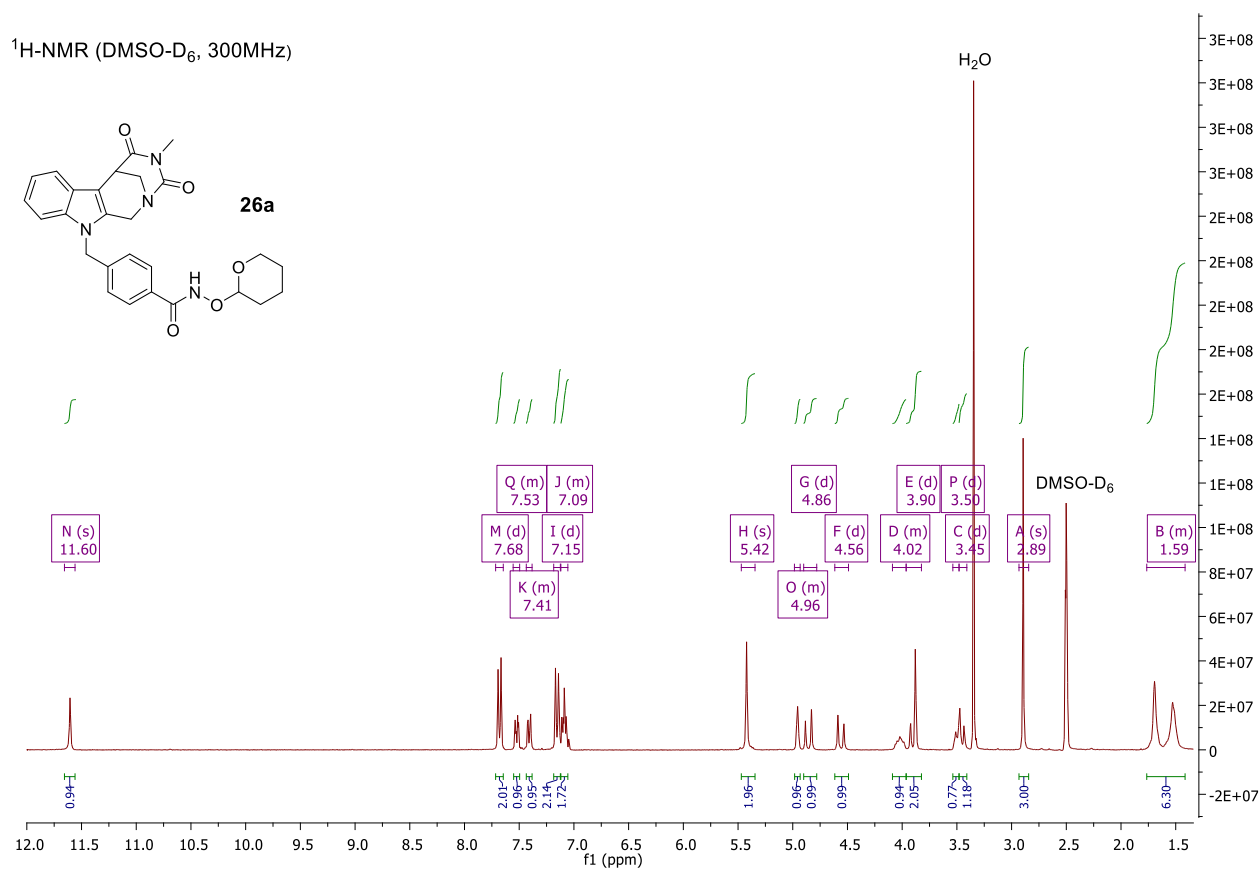


**Abb. A.6.** Darstellung des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von **22a**.

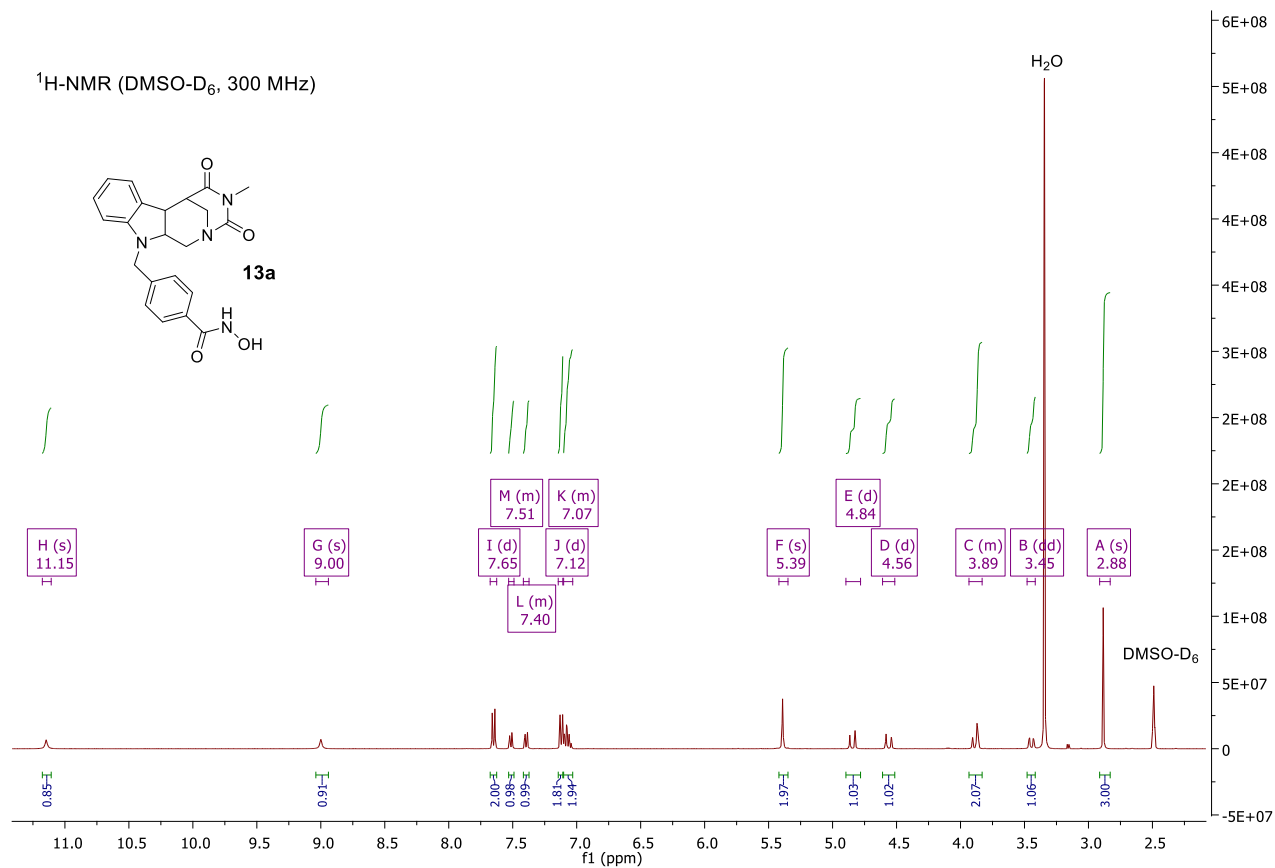
$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $\text{D}_6$ , 300MHz)



**Abb. A.7.** Darstellung des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von **23a**.



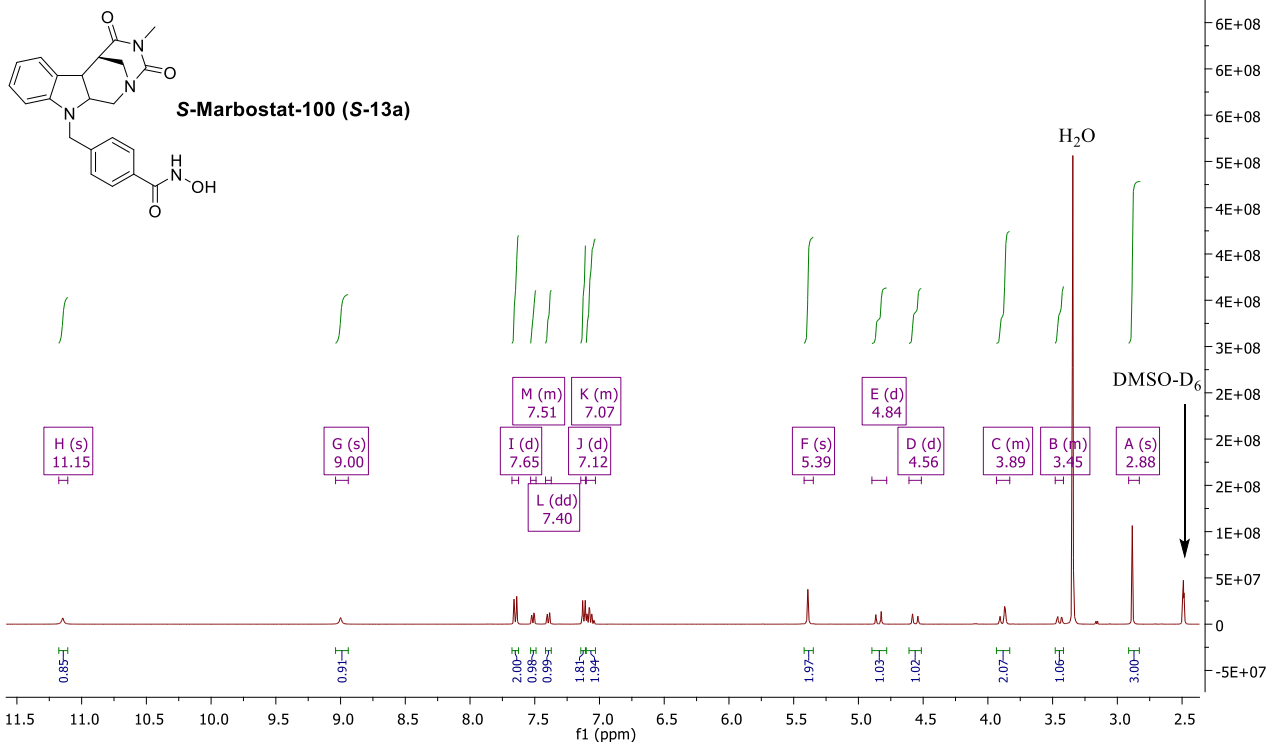
**Abb. A.8.** Darstellung des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums von **26a**.



**Abb. A.9.** Darstellung des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums von **13a**.

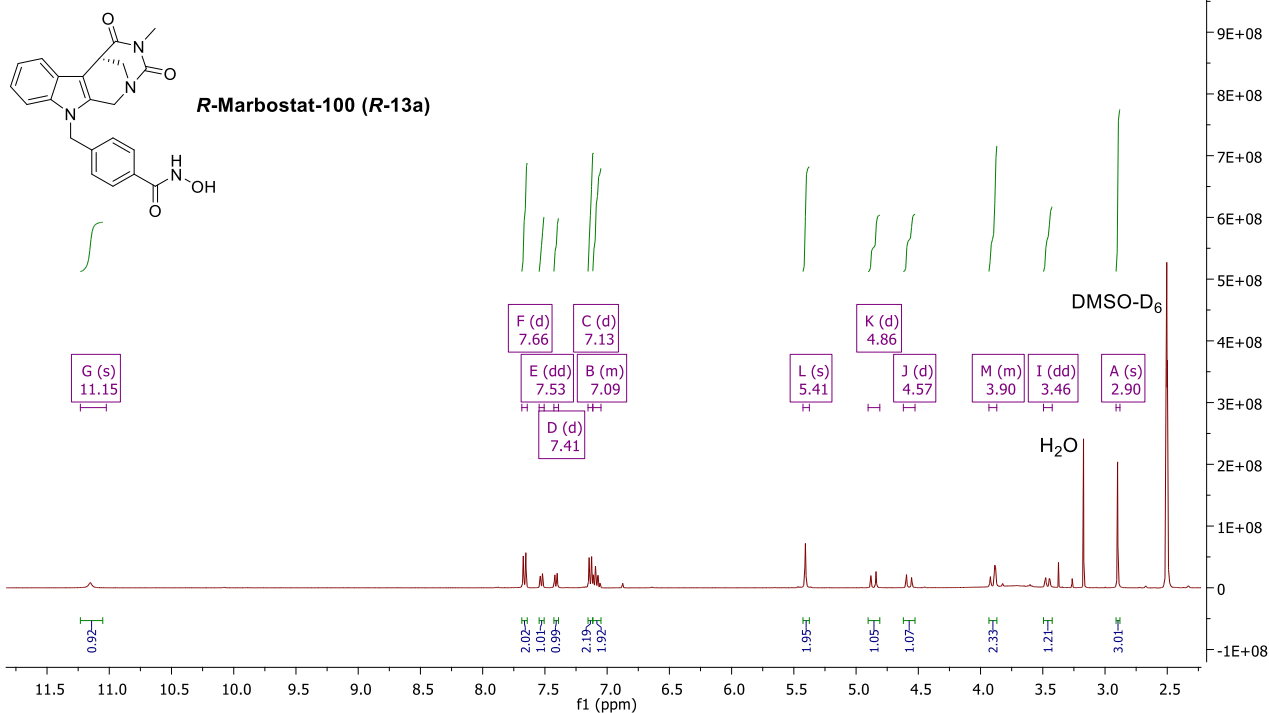


$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $\text{D}_6$ , 300 MHz)



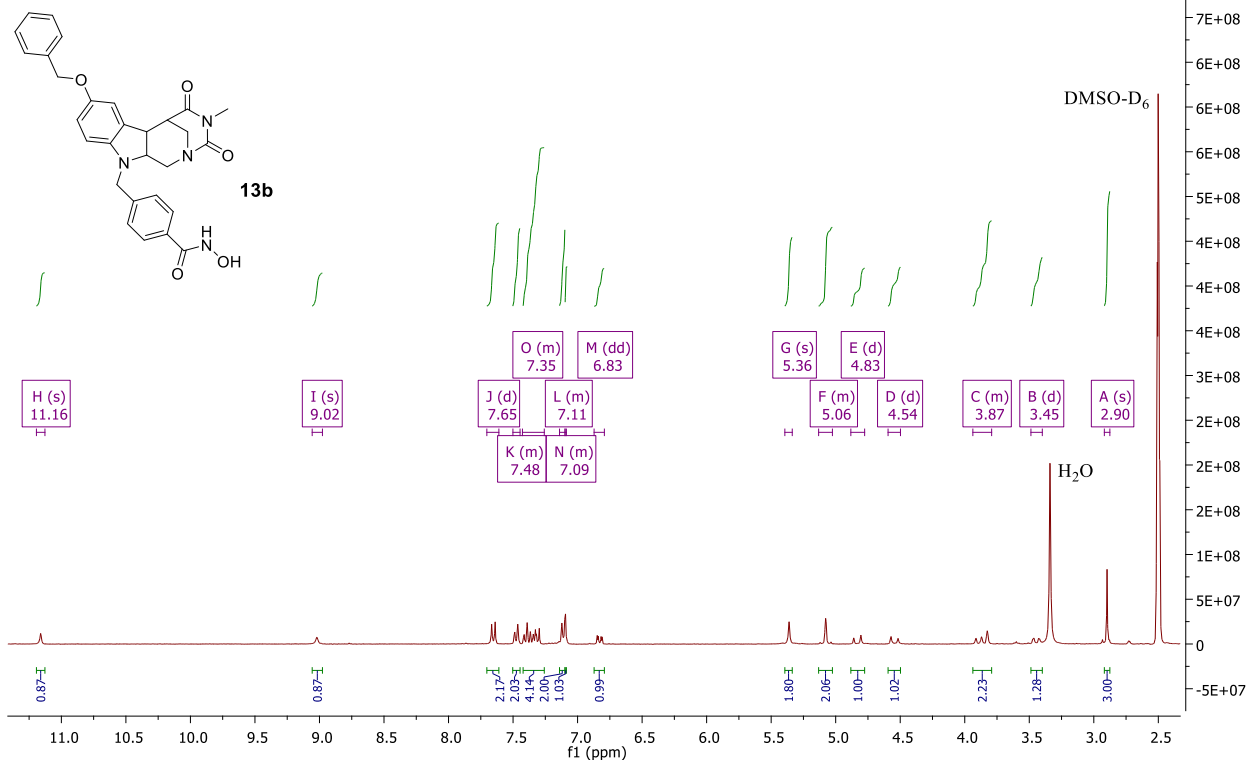
**Abb. A.10.** Darstellung des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von **S-13a**.

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $\text{D}_6$ , 300 MHz)



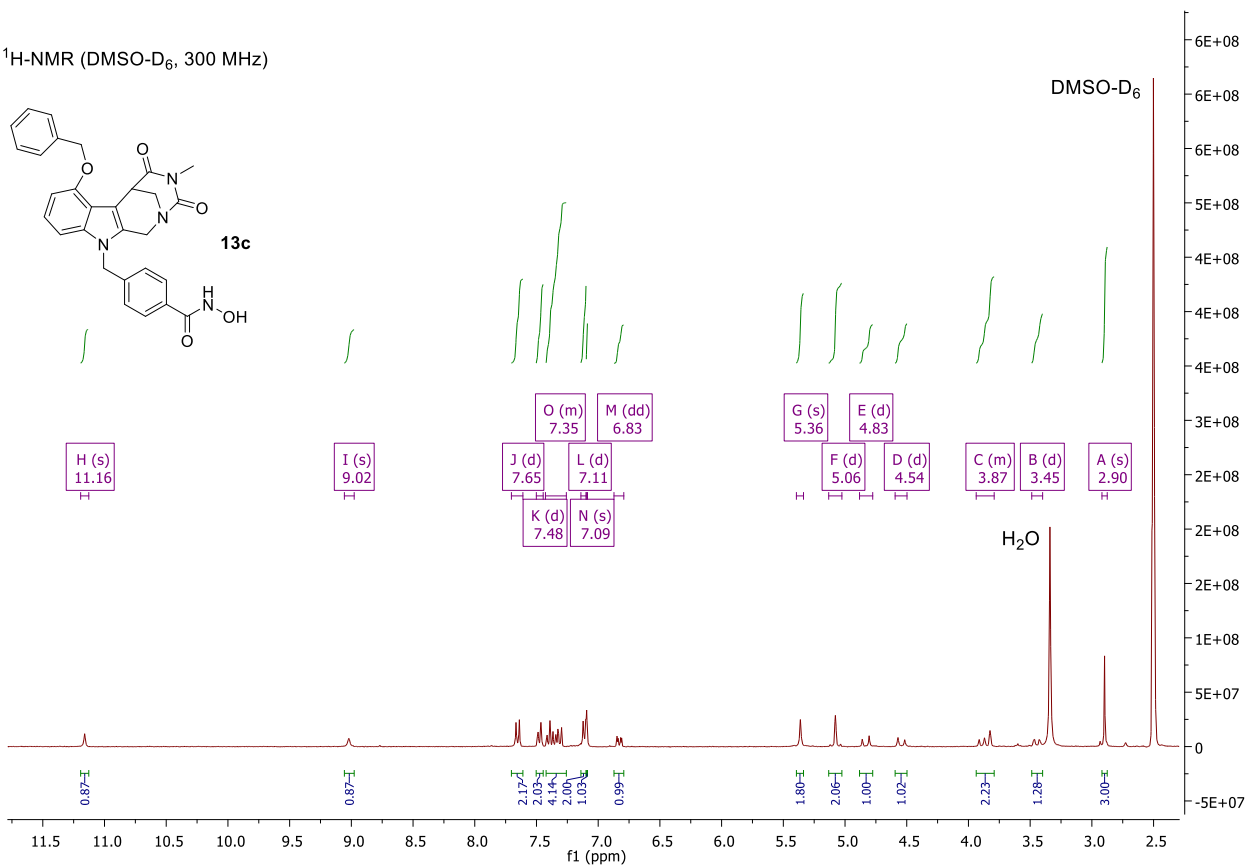
**Abb. A.11.** Darstellung des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von **R-13a**.

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-D<sub>6</sub>, 300 MHz)

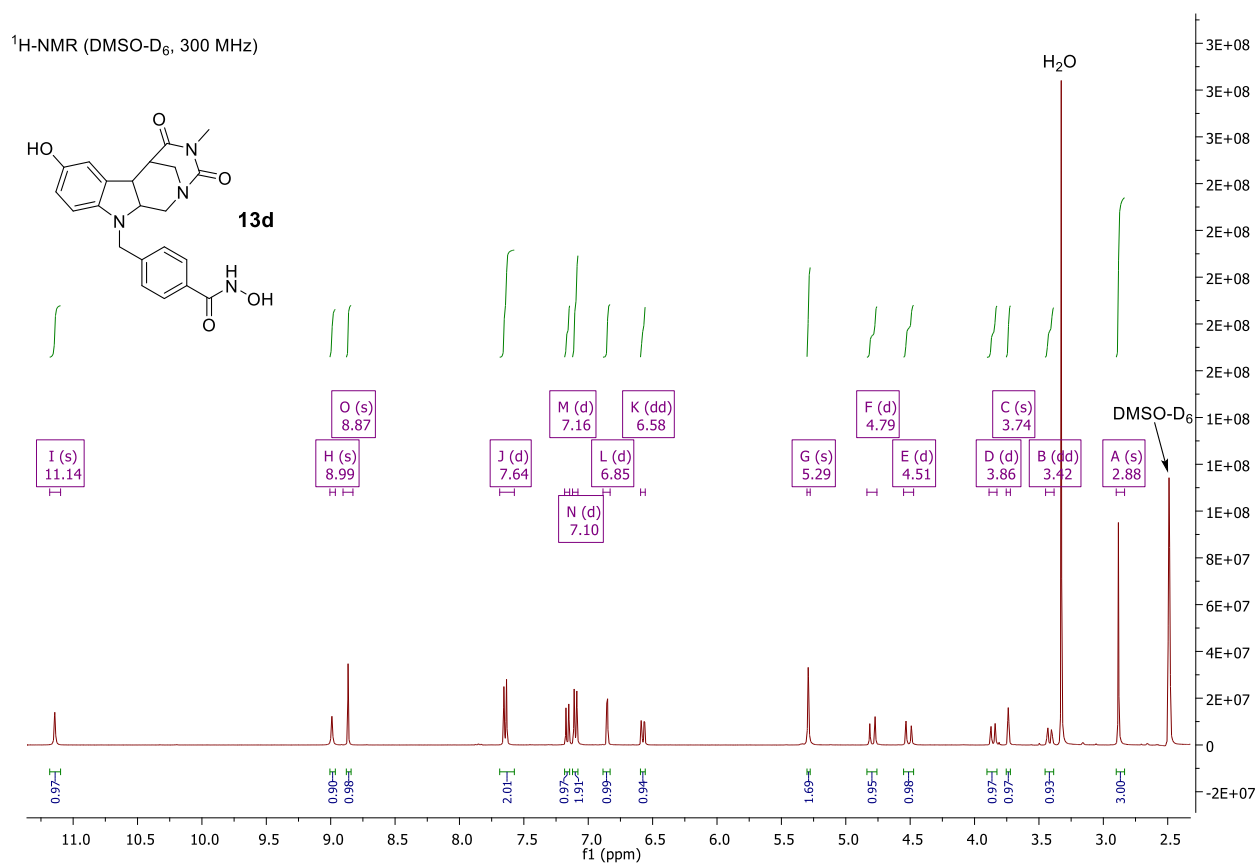


**Abb. A.12.** Darstellung des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums von **13b**.

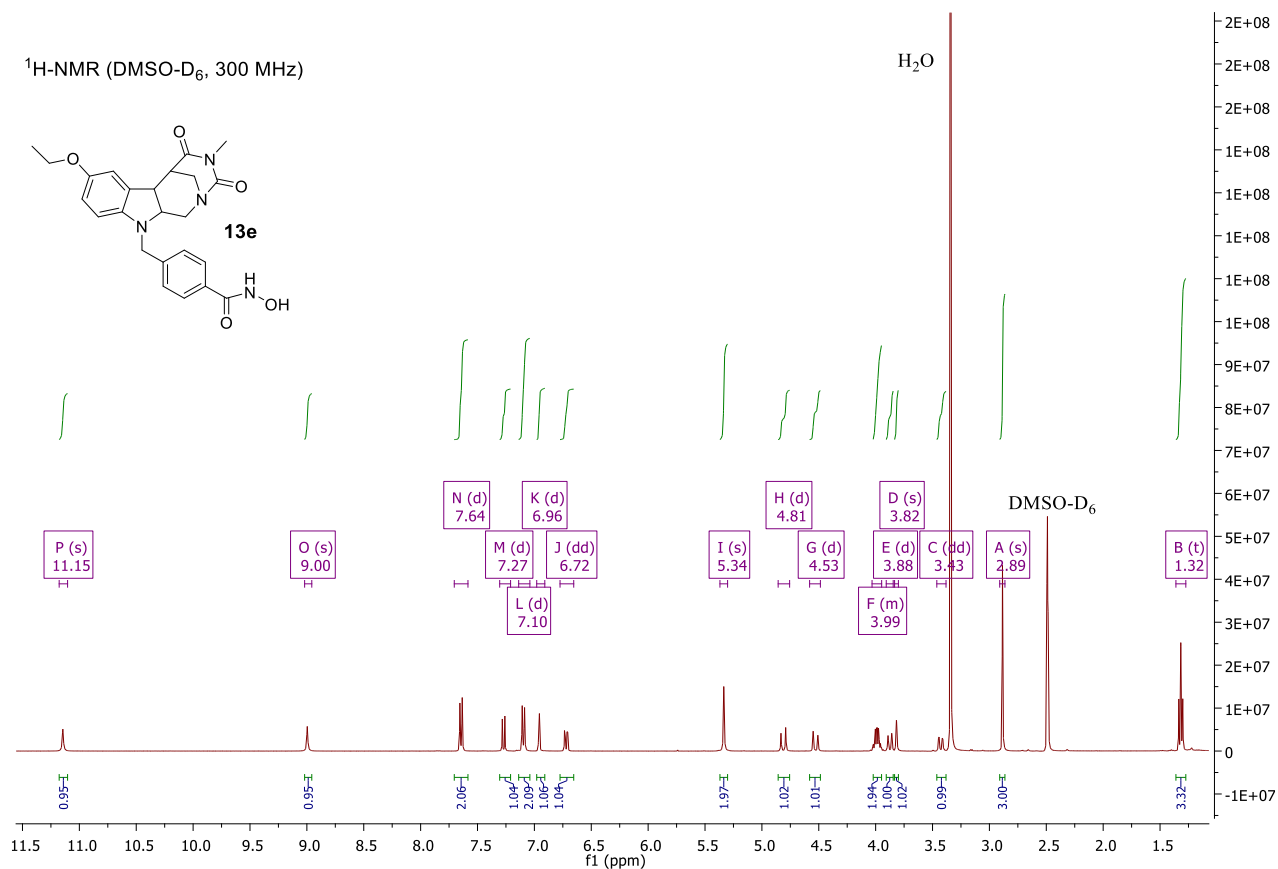
<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-D<sub>6</sub>, 300 MHz)



**Abb. A.13.** Darstellung des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums von **13c**.

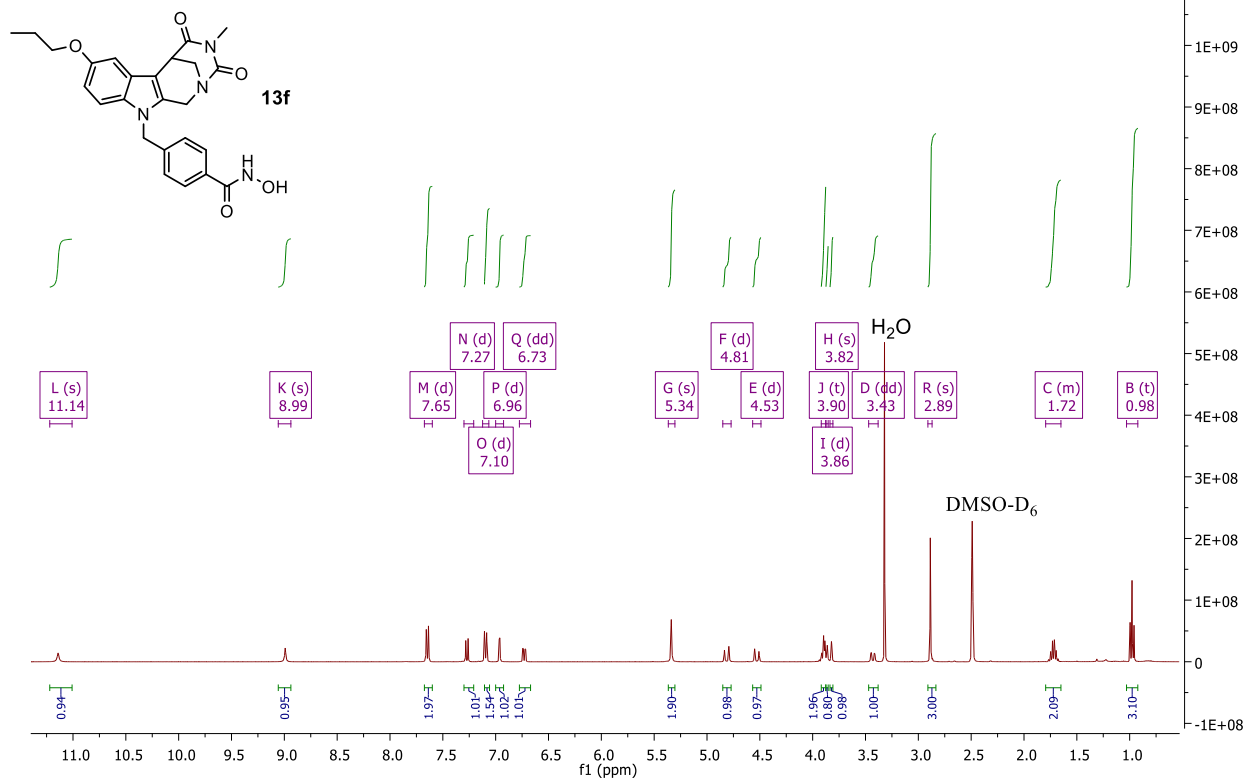


**Abb. A.14.** Darstellung des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums von **13d**.



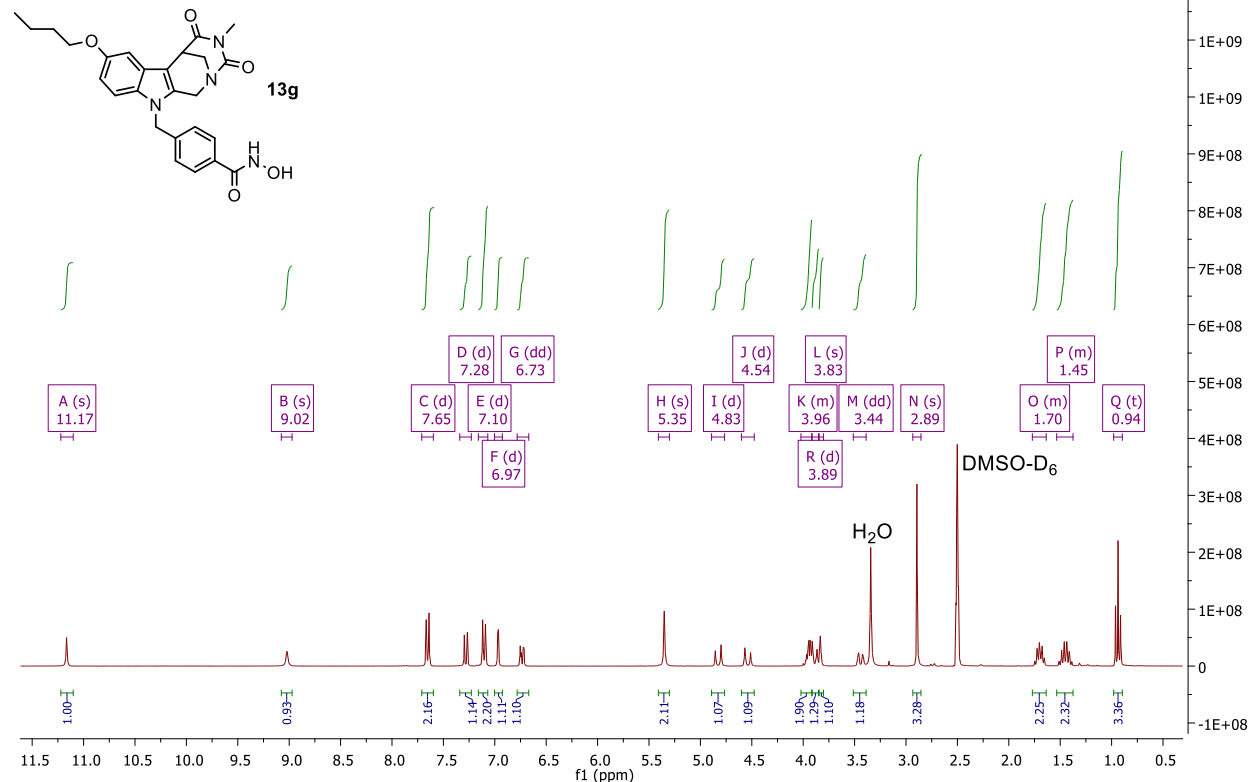
**Abb. A.15.** Darstellung des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums von **13e**.

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $\text{D}_6$ , 300 MHz)



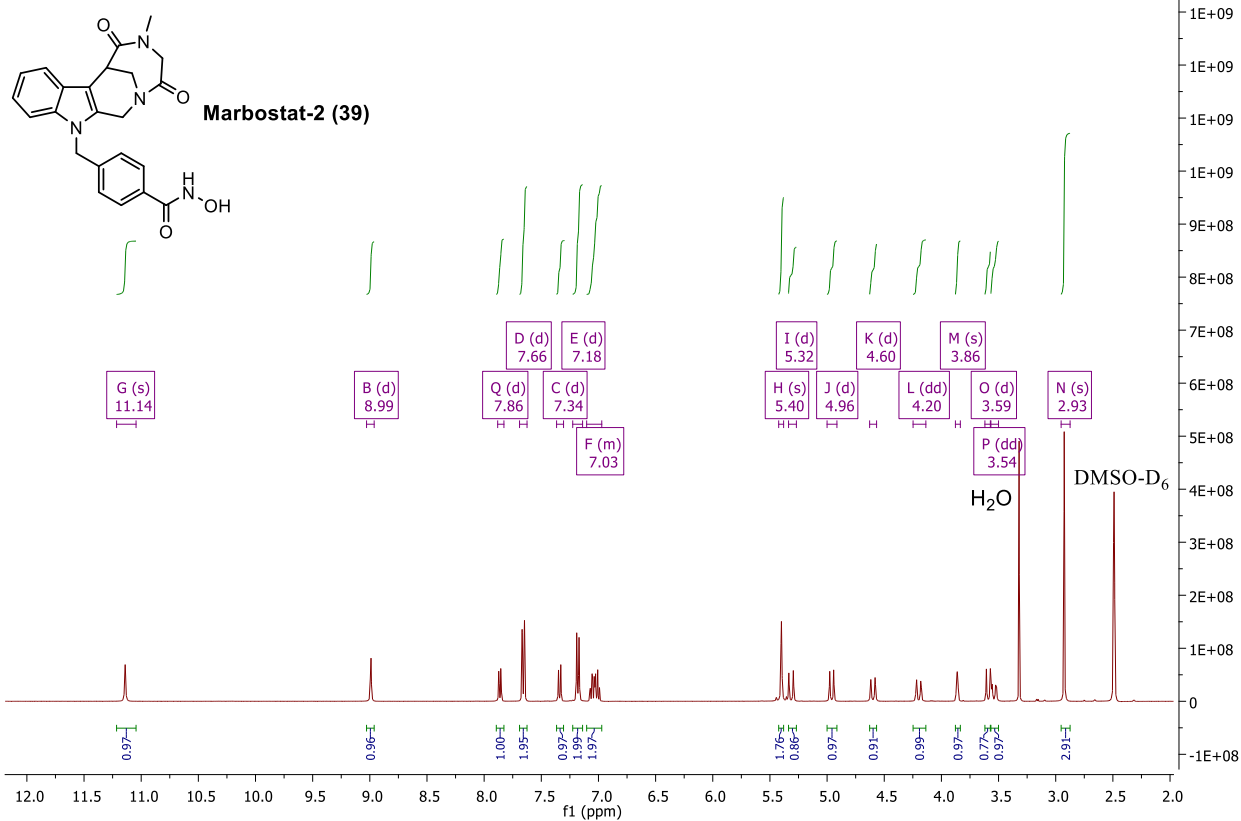
**Abb. A.16.** Darstellung des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von **13f**.

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $\text{D}_6$ , 300 MHz)



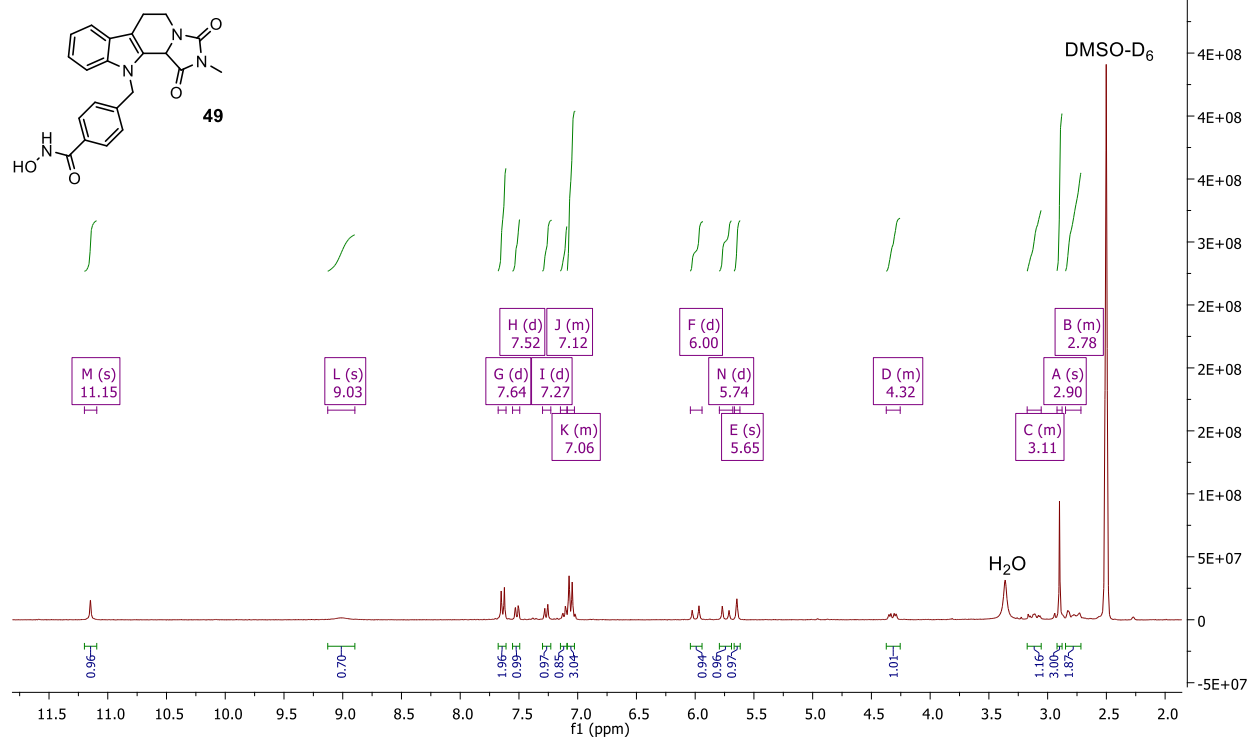
**Abb. A.17.** Darstellung des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von **13g**.

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $\text{D}_6$ , 300 MHz)



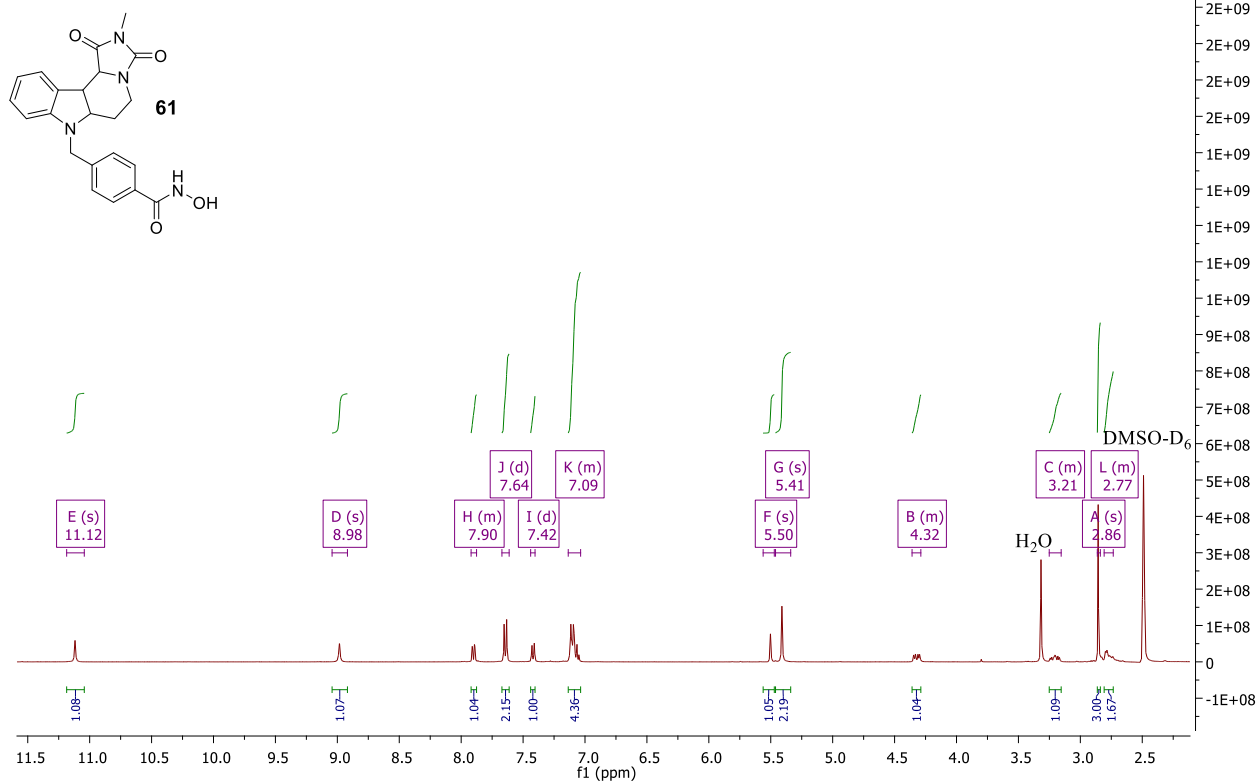
**Abb. A.18.** Darstellung des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von **39**.

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $\text{D}_6$ , 300 MHz)



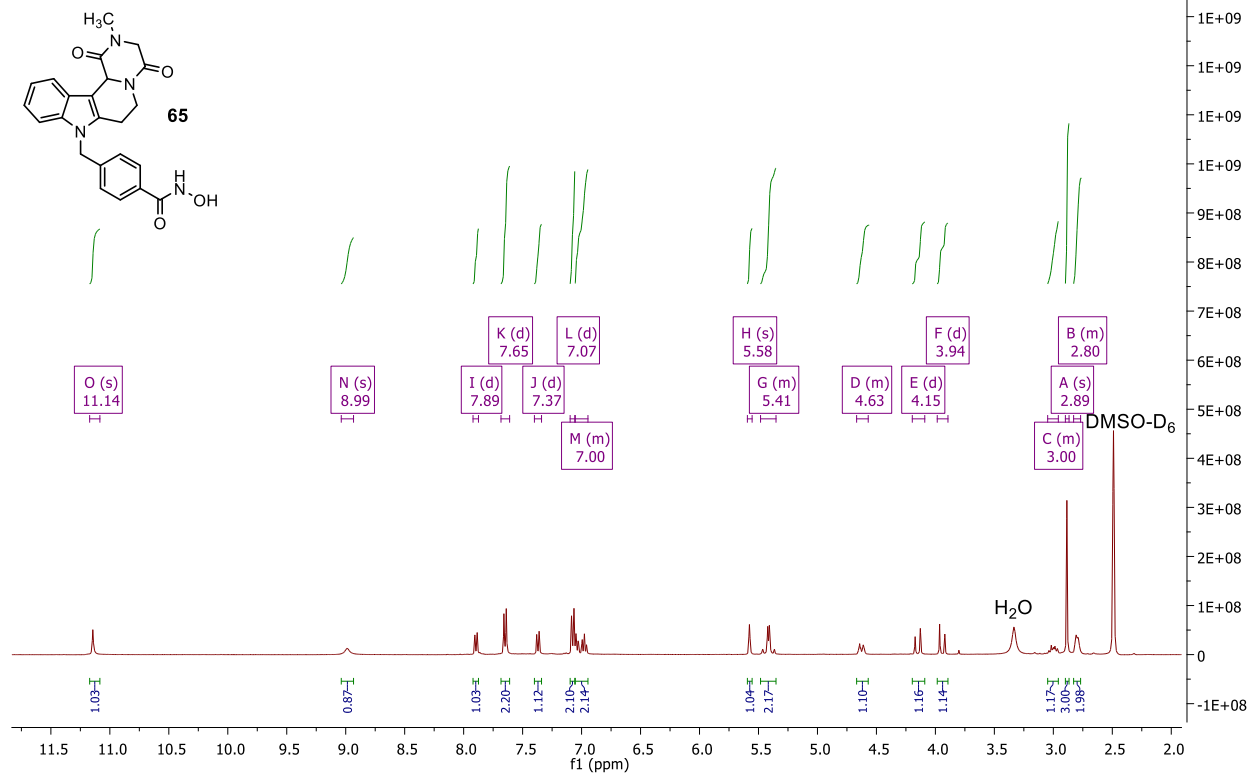
**Abb. A.19.** Darstellung des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von **49**.

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $\text{D}_6$ , 300 MHz)



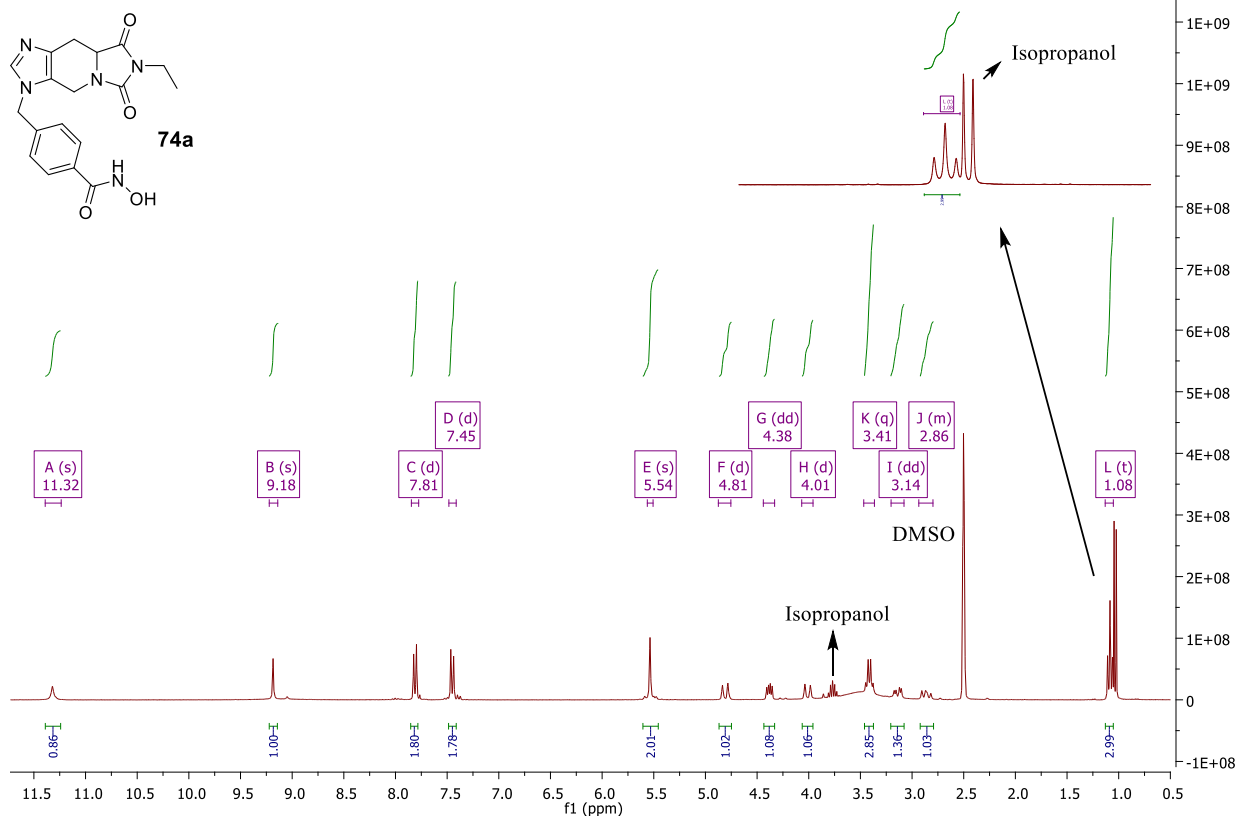
**Abb. A.20.** Darstellung des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von **61**.

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $\text{D}_6$ , 300 MHz)



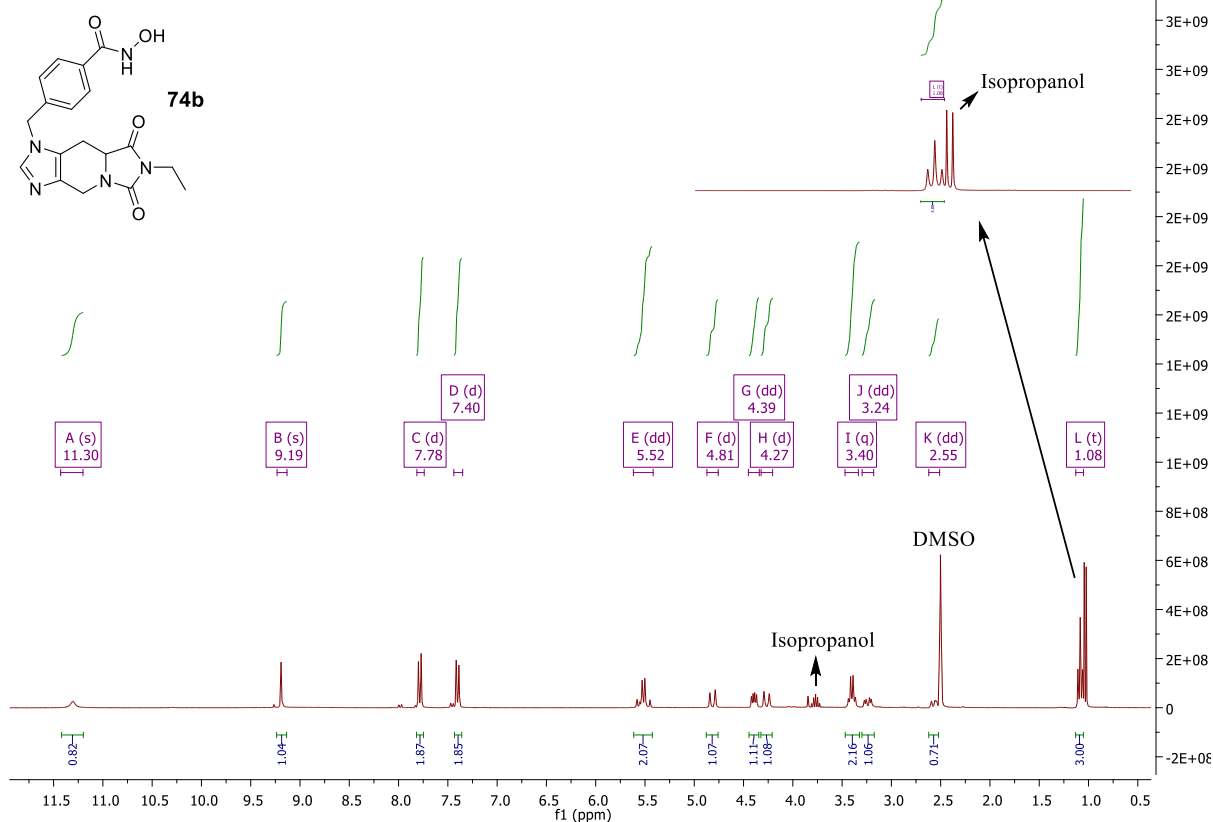
**Abb. A.21.** Darstellung des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von **65**.

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $\text{D}_6$ , 300 MHz)

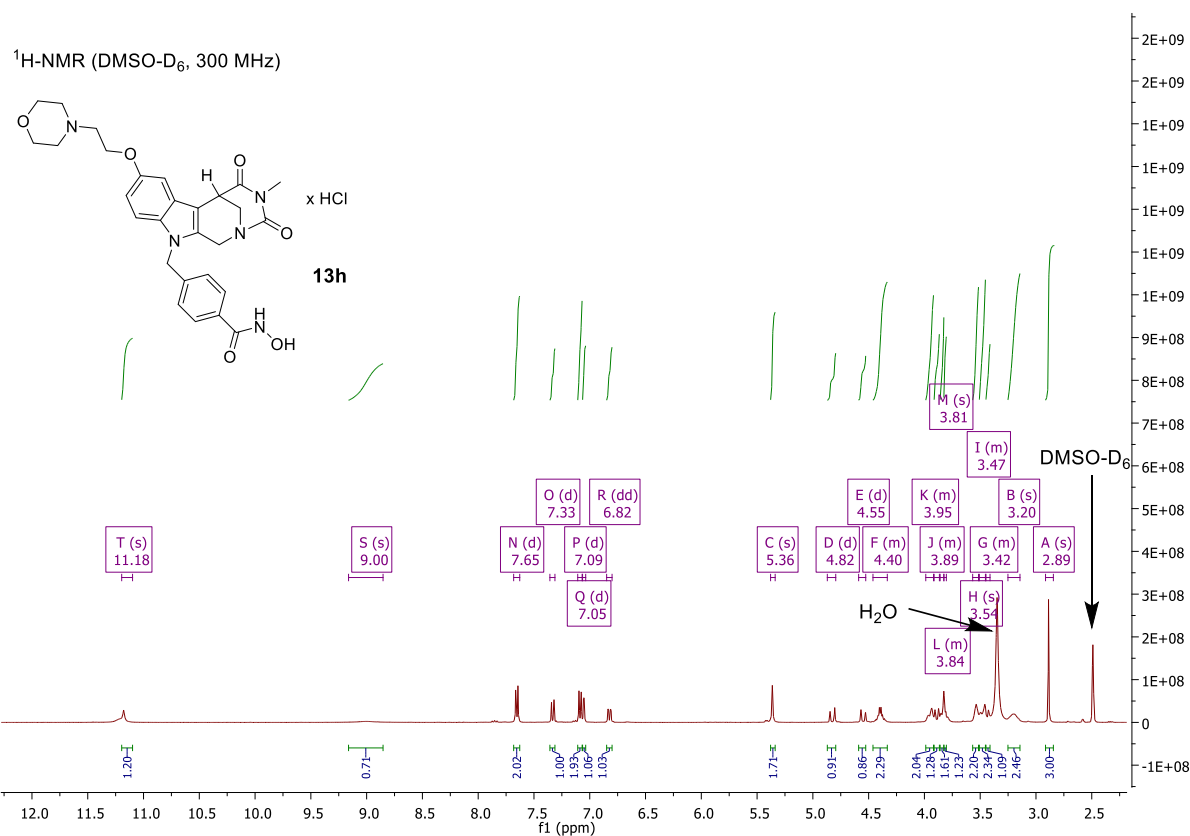


**Abb. A.22.** Darstellung des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von **74a**.

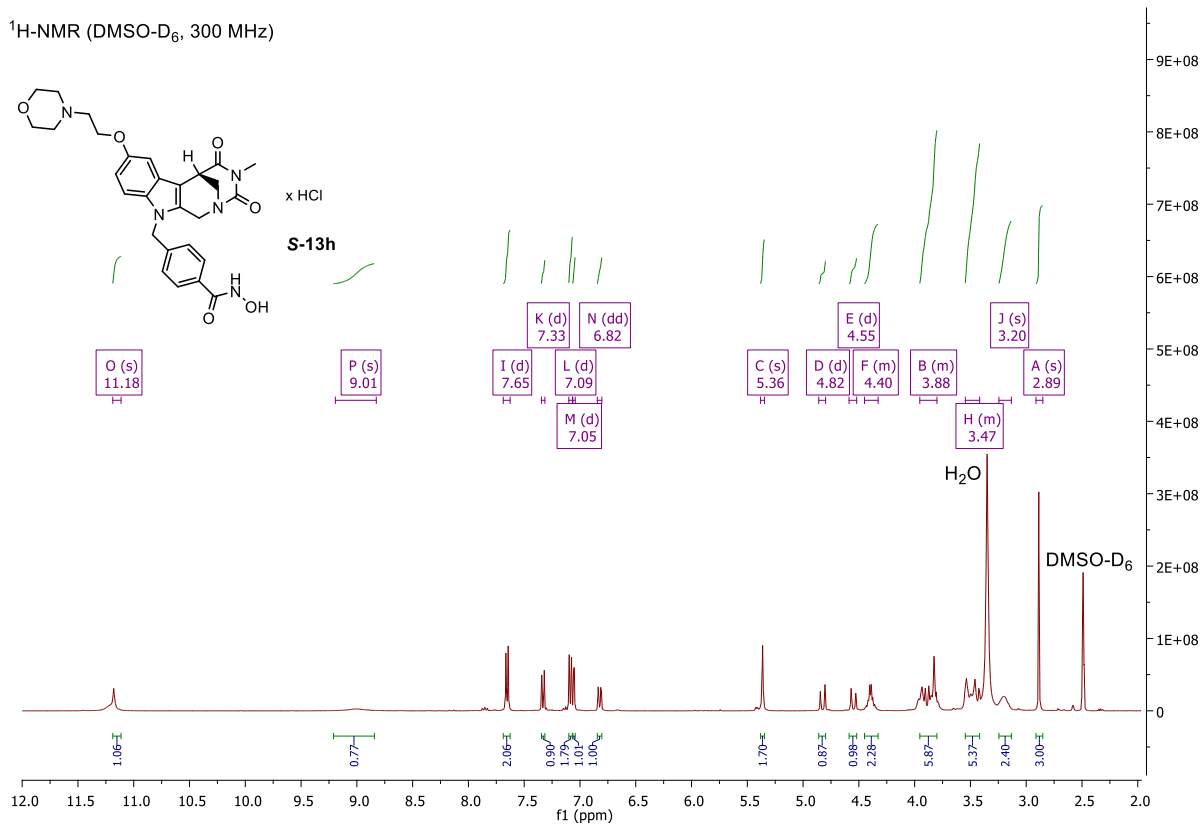
$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $\text{D}_6$ , 300 MHz)



**Abb. A.23.** Darstellung des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von **74b**.



**Abb. A.24.** Darstellung des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums von **13h**.



**Abb. A.25.** Darstellung des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums von **S-13h**.



$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $\text{D}_6$ , 300 MHz)

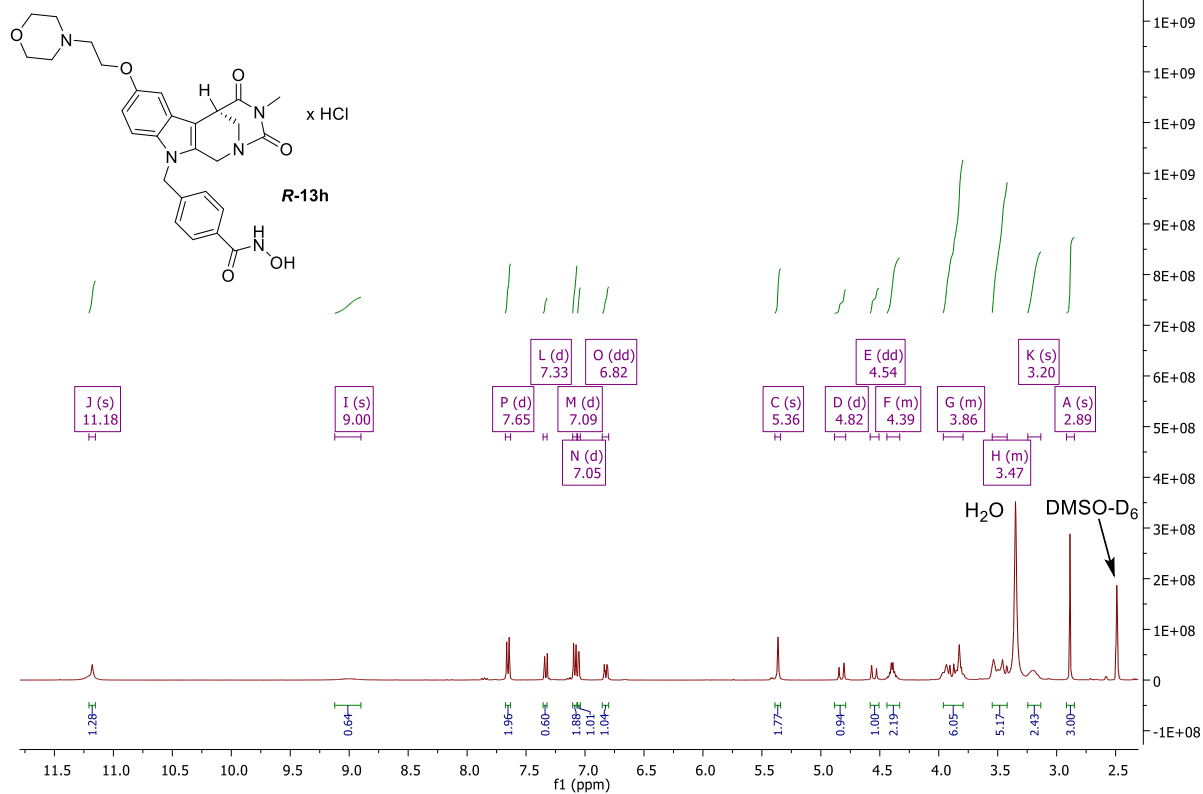


Abb. A.26. Darstellung des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von **R-13h**.

## 11.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1.1.</b> Schematische Darstellung der unterschiedlichen Verpackungsmöglichkeiten der DNA.....	2
<b>Abb. 1.2.</b> Schematische Darstellung des HAT / HDAC Gleichgewichtes und dessen Auswirkung auf die Regulierung der Genexpression.....	4
<b>Abb. 1.3.</b> Proteinstruktur der humanen HDAC6.....	8
<b>Abb. 1.4.</b> Darstellung des Einflusses von HDAC6 auf den Proteinabbau unter zellulären Stressbindungen.....	11
<b>Abb. 1.5.</b> Darstellung einer Auswahl unselektiver HDACi mit Vertretern aus jeder Strukturklasse. ....	17
<b>Abb. 1.6.</b> Eine Auswahl selektiver HDAC6i.....	21
<b>Abb. 2.1.</b> Schematische Darstellung des gemeinsamen Pharmakophors der HDACi unter Berücksichtigung der für die einzelnen Untereinheiten typischen Vertreter.....	26
<b>Abb. 2.2.</b> Überblick über die geplanten Kopfgruppen-Modifikationen (Kopfgruppen 1-6) unter Beibehaltung von Linker und ZBG.....	28
<b>Abb. 2.3.</b> Darstellung der Leitverbindung Marbostat-100 ( <b>13a</b> ) und des wasserlöslichen Derivates <b>13h</b> .....	29
<b>Abb. 3.1.</b> Synthese der Kopfgruppe 1.....	32
<b>Abb. 3.2.</b> Vergleich der inhibitorischen Aktivität eines Alkyl-vs. Aryl-Linkers anhand von HDAC1.....	34
<b>Abb. 3.3.</b> Synthese der HDACi mit Kopfgruppe 1.....	36
<b>Abb. 3.4.</b> Synthese der Derivate mit Kopfgruppe 1.....	37
<b>Abb. 3.5.</b> Synthese von <b>32</b> als stellvertretende Testverbindung für HP-1 für pharmakologische Untersuchungen.....	39
<b>Abb. 3.6.</b> Schematische Darstellung der verschiedenen Modifikationen in Bezug auf den D-Ring.....	39
<b>Abb. 3.7.</b> Synthese der Kopfgruppe 2.....	40
<b>Abb. 3.8.</b> Synthese des HDACi <b>39</b> mit homologer Hydantoin-Partialstruktur.....	41
<b>Abb. 3.9.</b> Synthese des HDACi <b>49</b> mit Kopfgruppe 3.....	42
<b>Abb. 3.10.</b> Synthese des Intermediates <b>55</b> für die Kopfgruppen 4 und 5.....	44
<b>Abb. 3.11.</b> Alkylierungsposition am Beispiel von <b>58</b> bei einem Aufbau der Kopfgruppen und anschließender Alkylierung.....	45

<b>Abb. 3.12.</b> Synthese der HDACi mit Kopfgruppen 4 und 5.....	46
<b>Abb. 3.13.</b> Darstellung des „Scaffolds“-Konzepts zur Umgehung des Patentschutzes am Beispiel der PDE-5-Hemmer Sildenafil ( <b>66</b> ) und Vardenafil ( <b>67</b> ).....	48
<b>Abb. 3.14.</b> Repräsentative Beispiele für „Scaffold Hoppings“ ausgehend von der Definition nach Bemis und Murcko.....	49
<b>Abb. 3.15.</b> Vergleich der Grundstruktur von Marbostat-100 ( <b>13a</b> ) mit der durch „Scaffold Hopping“ entstandenen HDAC6i <b>74a</b> und <b>74b</b> .....	50
<b>Abb. 3.16.</b> Dünnschichtchromatogramm (SiO <sub>2</sub> ) der beiden Regioisomere <b>79a</b> und <b>79b</b> .....	51
<b>Abb. 3.17.</b> Synthese der HDAC6i mit Kopfgruppe 6.....	52
<b>Abb. 3.18.</b> Ausschnitt <sup>1</sup> H / <sup>1</sup> H-NOESY-Spektrum von <b>79a</b> .....	55
<b>Abb. 3.19.</b> Ausschnitt <sup>1</sup> H / <sup>1</sup> H-NOESY-Spektrum von <b>79b</b> .....	56
<b>Abb. 3.20.</b> Asymmetrische Reduktion eines Ketoesters mit Hilfe der Bäckerhefe.....	58
<b>Abb. 3.21.</b> Geplante Syntheseroute für die Enantiomere <b>R-13a</b> und <b>S-13a</b> , sowie die dafür in Frage kommenden racemischen Ausgangsverbindungen (X).....	59
<b>Abb. 3.22.</b> Synthese von <b>82a</b> als racemische Referenzsubstanz für die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses mittels chiraler HPLC-Messung.....	59
<b>Abb. 3.23.</b> Chromatogramm der chiralen HPLC-Messung von <b>82a</b> (A) und (+)- <b>82a</b> (B) mit den dazugehörigen UV-Spektren und Isoplots.....	60
<b>Abb. 3.24.</b> Syntheseplanung enantiomerenreiner Derivate durch Diastereomerentrennung ausgehend von verschiedenen racemischen Vorstufen des Marbostat-100-Grundkörpers.....	62
<b>Abb. 3.25.</b> Synthese von ( <b>97a</b> ) und ( <b>97b</b> ).....	64
<b>Abb. 3.26.</b> Darstellung der Nitrovinylverbindung <b>101</b> .....	64
<b>Abb. 3.27.</b> Enantioselektive Synthese von <b>R-13a</b> und <b>S-13a</b> .....	67
<b>Abb. 3.28.</b> Struktur des Shift-Reagenzes ( <i>S</i> )-(+)-2,2,2-Trifluor-1-(9-anthryl)ethanol ( <b>106</b> ).....	69
<b>Abb. 3.29.</b> <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum der racemischen Kopfgruppe von Marbostat-100 ( <b>20a</b> ).....	70
<b>Abb. 3.30.</b> <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum der racemischen Kopfgruppe von Marbostat-100 ( <b>20a</b> ) unter Zusatz eines zweifachen molaren Überschusses des Anthrylalkohols <b>106</b> .....	70

<b>Abb. 3.31.</b> Exemplarischer Ausschnitt aus dem $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von <i>R</i> -Marbostat-100 ( <b>R-13a</b> ) bei Zusatz eines zweifachen molaren Überschusses an Anthrylalkohol <b>106</b> .	71
<b>Abb. 3.32.</b> Darstellung einer chiralen HPLC-Messung zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit am Beispiel von <b>R-26a</b> .	73
<b>Abb. 3.33.</b> Röntgenkristallstrukturen von <b>R-104</b> und <b>S-104</b> .	76
<b>Abb. 3.34.</b> Enantioselektive Synthese von <b>R-22d</b> und <b>S-22d</b> .	77
<b>Abb. 3.35.</b> Enantioselektive Synthese von <b>R-13h</b> und <b>S-13h</b> .	79
<b>Abb. 3.36.</b> Röntgenkristallstrukturen von <b>R-110</b> und <b>S-110</b> .	80
<b>Abb. 4.1.</b> Cheng-Prusoff-Gleichung.	83
<b>Abb. 5.1.</b> Die verschiedenen Zellzyklusphasen.	98
<b>Abb. 5.2.</b> Schematische Darstellung zur Ermittlung des DNA-Gehaltes in den verschiedenen Zellzyklusphasen.	99
<b>Abb. 5.3.</b> Western Blot Ergebnisse von Marbostat ( <b>13a</b> ), <b>13b</b> , <b>13c</b> , <b>13e</b> , <b>13f</b> und <b>13g</b> .	103
<b>Abb. 5.4.</b> Western Blot Ergebnisse von Marbostat ( <b>13a</b> ) und <b>39</b> .	104
<b>Abb. 5.5.</b> Western Blot Ergebnisse von Marbostat-100 ( <b>13a</b> ), <b>13d</b> , <b>13h</b> , <b>74a</b> und <b>74b</b> .	106
<b>Abb. 5.6.</b> Western Blot Ergebnisse von Marbostat ( <b>13a</b> ), <b>49</b> , <b>61</b> , <b>65</b> .	109
<b>Abb. 5.7.</b> Western Blot Ergebnisse von Marbostat ( <b>13a</b> ), <b>32</b> , <b>23a</b> , <b>13h</b> .	110
<b>Abb. 5.8.</b> Western Blot Ergebnisse von Marbostat ( <b>13a</b> ), <b>S-13a</b> und <b>R-13a</b> und <b>13h</b> .	111
<b>Abb. 5.9.</b> Western Blot Ergebnisse von Marbostat ( <b>13a</b> ), <b>13h</b> , <b>S-13h</b> und <b>R-13h</b> , <b>S-13a</b> und <b>R-13a</b> .	113
<b>Abb. 5.10.</b> Evaluierung der inhibitorischen Potenz von Marbostat-100 ( <b>13a</b> ).	114
<b>Abb. 5.11.</b> Evaluierung der inhibitorischen Potenz von Marbostat-100 ( <b>13a</b> ) in humanen Leukämie-Zelllinien.	115
<b>Abb. 5.12.</b> Evaluierung des biologischen Effektes von Marbostat-100 ( <b>13a</b> ) in höheren Konzentrationen.	116
<b>Abb. 5.13.</b> Darstellung der Ergebnisse der Kinetik-Studie der Leitverbindung <b>13a</b> .	117
<b>Abb. 5.14.</b> Evaluierung der Spezifität von Marbostat-100 ( <b>13a</b> ).	118
<b>Abb. 5.15.</b> Vergleich der Selektivität und Potenz von Marbostat-100 ( <b>13a</b> ) mit dem selektiven HDAC6i Tubastatin A ( <b>10</b> ) und dem potenten pan-HDACi LBH589 ( <b>3</b> ).	120

<b>Abb. 5.16.</b> Evaluierung des Einflusses von Marbostat-100 ( <b>13a</b> ), Tubastatin A ( <b>10</b> ) und MS-275 ( <b>6</b> ) auf die Zellzyklusverteilung.....	123
<b>Abb. 5.17.</b> Darstellung des Einflusses von Marbostat-100 ( <b>13a</b> ) auf Zellzyklusveränderungen und den Zelltod.....	125
<b>Abb. 5.18.</b> Einfluss von Marbostat-100 ( <b>13a</b> ) auf die HDAC6 Aktivität bei Betrachtung der Organe Leber und Niere.....	126
<b>Abb. 6.1.</b> Der Elektronentransfer zwischen NADPH-P450-Reduktase und CYP450.....	129
<b>Abb. 6.2.</b> Relevante humane CYP-Isoformen und deren Anteil am Arzneistoffmetabolismus.....	131
<b>Abb. 6.3.</b> Anteil der einzelnen Phase II-Enzyme an der Biotransformation.....	135
<b>Abb. 6.4.</b> Konjugation eines nukleophilen Substrates mit der Uridin-5'-diphospho- $\alpha$ -D-glucuronsäure.....	135
<b>Abb. 6.5.</b> Phase II-Reaktionsmechanismus katalysiert durch SULT.....	136
<b>Abb. 6.6.</b> Acetylierung von Arylaminen durch NAT im Rahmen der Phase II-Biotransformation.....	137
<b>Abb. 6.7.</b> Bildung von Glutathion-Konjugaten im Rahmen der Phase II-Biotransformation.....	137
<b>Abb. 6.8.</b> Phase I- und II-bedingte Metabolisierungsprodukte im Rahmen eines Biotransformationsprozesses.....	138
<b>Abb. 6.9.</b> Präparation der subzellulären Fraktionen.....	139
<b>Abb. 6.10.</b> Testsysteme zur Untersuchung des Arzneistoffmetabolismus.....	147
<b>Abb. 6.11.</b> Einfluss der Inkubationsverlängerung auf die Stabilität von 7-EC.....	152
<b>Abb. 6.12.</b> Phase I-Metabolisierung des 7-EC bei einer Inkubationszeit von 1 Std.....	153
<b>Abb. 6.13.</b> Phase I-Metabolisierung des 7-EC bei einer Inkubationszeit von 3 Std.....	154
<b>Abb. 6.14.</b> Phase I+II -Metabolisierung des 7-EC bei einer Inkubationszeit von 1 Std.....	154
<b>Abb. 6.15.</b> Phase I+II-Metabolisierung des 7-EC bei einer Inkubationszeit von 3 Std.....	155
<b>Abb. 6.16.</b> Lösungsmiteleinflüsse auf die Stabilität der Testsubstanz <b>13h</b> .....	157
<b>Abb. 6.17.</b> Überblick über die möglichen Strukturen für die Hydrolyseprodukte (HP-1, HP-2).....	159

<b>Abb. 6.18.</b> MS-MS-Messung zur Strukturaufklärung von HP-1.	160
<b>Abb. 6.19.</b> Einfluss der „Stopplösung“ auf die Stabilität der Testsubstanz <b>13h</b> im Kaliumphosphat-Puffer.	163
<b>Abb. 6.20.</b> Darstellung der Nebenprodukte, die je nach verwendeter „Stopplösung“ entstehen können.	164
<b>Abb. 6.21.</b> Untersuchung des Einflusses der zeitlichen Zugabe von NADPH zum Inkubationssystem (Methoden 1 und 2) auf die Biotransformation.	167
<b>Abb. 6.22.</b> Darstellung der konzentrationsabhängigen Auswirkung von <b>13h</b> auf die relative Metabolitmenge von 7-EC.	173
<b>Abb. 7.1.</b> Verteilung der rheumatischen Knoten im Körper des Menschen.	182
<b>Abb. 7.2.</b> Überblick über die Faktoren, die zur Aktivierung der Immunzellen führen.	184
<b>Abb. 7.3.</b> Darstellung eines gesunden Gelenkes im Vergleich zu einem arthritischen Gelenk.	186
<b>Abb. 7.4.</b> Überblick über die Prozesse im Gelenk.	188
<b>Abb. 7.5.</b> Antirheumatische Wirkungen von HDACi.	206
<b>Abb. 7.6.</b> Graphische Darstellung des <i>in vivo</i> -Versuchsablaufs.	213
<b>Abb. 7.7.</b> Darstellung des klinisch-arthritischen Scores nach einer Behandlung mit Marbostat-100 ( <b>13a</b> ) und Tubastatin A ( <b>10</b> ).	215
<b>Abb. 7.8.</b> Darstellung der Pfotendicke nach einer Behandlung mit Marbostat-100 ( <b>13a</b> ) und Tubastatin A ( <b>10</b> ).	216
<b>Abb. 7.9.</b> Darstellung des Körpergewichtes nach einer Behandlung mit Marbostat-100 ( <b>13a</b> ) und Tubastatin A ( <b>10</b> ).	217
<b>Abb. 7.10.</b> Darstellung des Anti-Kollagen Typ II Antikörpertiters nach einer Behandlung mit Marbostat-100 ( <b>13a</b> ) und Tubastatin A ( <b>10</b> ).	218
<b>Abb. 7.11.</b> Darstellung der IL-6-Konzentration nach einer Behandlung mit Marbostat-100 ( <b>13a</b> ) und Tubastatin A ( <b>10</b> ).	219
<b>Abb. 7.12.</b> Darstellung der Blutbild-Ergebnisse nach einer Behandlung mit Marbostat-100 ( <b>13a</b> ) und Tubastatin A ( <b>10</b> ).	220
<b>Abb. 7.13.</b> Darstellung der histologischen Ergebnisse nach einer Behandlung mit Marbostat-100 ( <b>13a</b> ) und Tubastatin A ( <b>10</b> ).	221
<b>Abb. 7.14.</b> Darstellung des histologisch-arthritischen scores nach einer Behandlung mit Marbostat-100 ( <b>13a</b> ) und Tubastatin A ( <b>10</b> ).	222
<b>Abb. 7.15.</b> Darstellung des klinisch-arthritischen scores nach einer Behandlung mit <i>R</i> -Marbostat-100 ( <b>R-13a</b> ) und <b>13h</b> .	225

<b>Abb. 7.16.</b> Gelenkveränderungen: ein Vergleich zwischen therapiertem und krankem Tier.....	226
<b>Abb. 7.17.</b> Darstellung des BS / BV- Verhältnisses nach einer Behandlung mit <i>R</i> -Marbostat-100 ( <b><i>R</i>-13a</b> ) und <b>13h</b> .....	227
<b>Abb. 7.18.</b> Darstellung der $\mu$ -CT-Aufnahmen des Knies nach einer Behandlung mit <i>R</i> -Marbostat-100 ( <b><i>R</i>-13a</b> ) und <b>13h</b> .....	227
<b>Abb. 7.19.</b> Darstellung der Ergebnisse des Blutbildes nach einer Behandlung mit <i>R</i> -Marbostat-100 ( <b><i>R</i>-13a</b> ) und <b>13h</b> .....	228
<b>Abb. 8.1.</b> Allgemeines Modell des Pharmacophors von HDACis am Beispiel der Leitverbindung Marbostat-100 ( <b>13a</b> ).....	231
<b>Abb. 8.2.</b> Einfluss der Ausrichtung und Größe des D-Ringes auf die Inhibitorwirkung in Relation zur Leitverbindung <b>13a</b> .....	232
<b>Abb. 8.3.</b> Einfluss des Austausches der Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-Struktur durch eine Tetrahydro- $\gamma$ -carbolin- Struktur auf die Hemmwirkung in Relation zur Leitverbindung <b>13a</b> .....	233
<b>Abb. 8.4.</b> Einfluss des Austausches des Grundkörpers durch eine Histidin-Substruktur auf die Hemmwirkung in Relation zur Leitverbindung <b>13a</b> .....	234
<b>Abb. 10.1.</b> Darstellung der Neubauer-Zählkammer.....	363
<b>Abb. 10.2.</b> Mathematische Gleichung zur Ermittlung der Zellzahl.....	364
<b>Abb. 10.3.</b> Darstellung der analytischen Reinheit der Testsubstanz <b>13h</b> .....	386
<b>Abb. A.1.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>16a</b> .....	405
<b>Abb. A.2.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>17a</b> .....	406
<b>Abb. A.3.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>18a</b> .....	406
<b>Abb. A.4.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>19a</b> .....	407
<b>Abb. A.5.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>20a</b> .....	407
<b>Abb. A.6.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>22a</b> .....	408
<b>Abb. A.7.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>23a</b> .....	408
<b>Abb. A.8.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>26a</b> .....	409
<b>Abb. A.9.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>13a</b> .....	409
<b>Abb. A.10.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>S-13a</b> .....	410
<b>Abb. A.11.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>R-13a</b> .....	410
<b>Abb. A.12.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>13b</b> .....	411
<b>Abb. A.13.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>13c</b> .....	411

<b>Abb. A.14.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>13d</b> .	412
<b>Abb. A.15.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>13e</b> .	412
<b>Abb. A.16.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>13f</b> .	413
<b>Abb. A.17.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>13g</b> .	413
<b>Abb. A.18.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>39</b> .	414
<b>Abb. A.19.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>49</b> .	414
<b>Abb. A.20.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>61</b> .	415
<b>Abb. A.21.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>65</b> .	415
<b>Abb. A.22.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>74a</b> .	416
<b>Abb. A.23.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>74b</b> .	416
<b>Abb. A.24.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>13h</b> .	417
<b>Abb. A.25.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>S-13h</b> .	417
<b>Abb. A.26.</b> Darstellung des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von <b>R-13h</b> .	418



## 11.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 3.1.</b> Evaluierung der Molmenge an Katalysator.....	65
<b>Tab. 3.2.</b> Darstellung der Retentionszeiten und Peakflächen bei den chiralen HPLC-Messungen <b>26a</b> und <b>R-26a</b> .....	74
<b>Tab. 4.1.</b> Ergebnisse der Inhibitoren mit der Kopfgruppe 1 im HDAC-Inhibitions-Assay .....	85
<b>Tab. 4.2.</b> Vergleich der Enzym-Inhibitionsdaten für Marbostat-100 ( <b>13a</b> ) gegenüber HDAC-Subtypen HDAC1-8 und HDAC10-11 mit den Referenzsubstanzen TSA ( <b>2</b> ) und TMP 269 ( <b>112</b> ).....	89
<b>Tab. 4.3.</b> Ergebnisse der Inhibitoren mit den Kopfgruppen 2-6 im HDAC-Inhibitions-Assay.....	91
<b>Tab. 4.4.</b> Ergebnisse der enantiomerenreinen Inhibitoren mit der Kopfgruppe 1 im HDAC-Inhibitions-Assay.....	93
<b>Tab. 5.1.</b> Vergleich der Wasserlöslichkeit von <b>13h</b> mit der Leitverbindung Marbostat-100 ( <b>13a</b> ).....	107
<b>Tab. 6.1.</b> Signalwege, die im Rahmen der Arzneistoff-Metabolisierung von “non-CYP450”-Enzymen katalysiert werden.....	134
<b>Tab. 6.2.</b> Vor- und Nachteile der Supersome als <i>in vitro</i> -Modell.....	140
<b>Tab. 6.3.</b> Vor- und Nachteile des Cytosols als <i>in vitro</i> -Modell.....	141
<b>Tab. 6.4.</b> Vor- und Nachteile der S9-Fraktion als <i>in vitro</i> -Modell.....	141
<b>Tab. 6.5.</b> Vor- und Nachteile der Zelllinien als <i>in vitro</i> -Modell. ....	142
<b>Tab. 6.6.</b> Vor- und Nachteile der transgenen Zelllinien als <i>in vitro</i> -Modell.....	142
<b>Tab. 6.7.</b> Vor- und Nachteile der Hepatozyten als <i>in vitro</i> -Modell.....	143
<b>Tab. 6.8.</b> Vor- und Nachteile der Leberschnitte als <i>in vitro</i> -Modell.....	144
<b>Tab. 6.9.</b> Vor- und Nachteile der isolierten perfundierten Leber als <i>in vitro</i> -Modell.....	144
<b>Tab. 6.10.</b> Vor- und Nachteile der humanen Lebermikrosome als <i>in vitro</i> -Modell.....	145
<b>Tab. 6.11.</b> Übersicht der verschiedenen <i>in vitro</i> -Modelle je nach Forschungsschwerpunkt.....	148
<b>Tab. 6.12.</b> Darstellung der massenspektrometrischen Daten zur <b>Abb. 6.11</b> .....	153
<b>Tab. 6.13.</b> Ergebnisse der LC-MS, ESI <sup>+</sup> -Messung für Phase I und Phase I+II.....	155
<b>Tab. 6.14.</b> Darstellung der massenspektrometrisch ermittelten Ergebnisse aus dem Experiment DMSO vs. H <sub>2</sub> O.....	157
<b>Tab. 6.15.</b> Darstellung der wesentlichen Fragment-Ionen.....	161

<b>Tab. 6.16.</b> Übersicht über die MS (LC-MS, ESI <sup>+</sup> ) - Ergebnisse zum Einfluss der „Stopplösung“ auf die Stabilität.....	163
<b>Tab. 6.17.</b> Darstellung der MS (LC-MS, ESI <sup>+</sup> )-Ergebnisse zum Einfluss der „Stopplösung“ auf die Bildung von Reaktionsprodukten.....	164
<b>Tab. 6.18.</b> MS (LC-MS, ESI <sup>+</sup> )-Ergebnisse zum Einfluss der zeitlichen Zugabe von NADPH zum Inkubationssystem (Methoden 1 und 2).....	169
<b>Tab. 6.19.</b> Auswirkung der Zugabe von <b>13h</b> auf die Peakflächen der 7-EC-Metabolite (Phase I) anhand von MS (LC-MS, ESI <sup>+/-</sup> )-Messungen. ....	174
<b>Tab. 7.1.</b> Darstellung der vier Kategorien der ACR / EULAR-Klassifizierung von 2010.....	200
<b>Tab. 9.1.</b> Darstellung der analytischen HPLC-Methode A.....	243
<b>Tab. 9.2.</b> Darstellung der analytischen HPLC-Methode B.....	243
<b>Tab. 9.3.</b> Darstellung der präparativen HPLC-Methode A.....	244
<b>Tab. 9.4.</b> Darstellung der präparativen HPLC-Methode B.....	244
<b>Tab. 10.1.</b> Darstellung der HDAC-Substrate und ihrer K <sub>m</sub> -Werte.....	360
<b>Tab. 10.2.</b> Pipettierschema der Standardkonzentrationsreihe vom bovinen Albumin.....	367
<b>Tab. 10.3.</b> Bestandteile des Bradford-Reagenzes.....	367
<b>Tab. 10.4.</b> Die Funktion der einzelnen Bestandteile des Lämmli- Puffers.....	368
<b>Tab. 10.5.</b> Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.....	370
<b>Tab. 10.6.</b> Bestandteile des Trenngels.....	370
<b>Tab. 10.7.</b> Bestandteile des Sammelgels.....	371
<b>Tab. 10.8.</b> OECD- Richtlinie zur Bestimmung der Wasserlöslichkeit.....	371
<b>Tab. 10.9.</b> Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Antikörper für die zellulären Untersuchungen.....	374
<b>Tab. 10.10.</b> Bestandteile des Dulbecco PBS-Puffer. ....	379
<b>Tab. 10.11.</b> Veranschaulichung des Pipettierschemas für Methode 1.....	381
<b>Tab. 10.12.</b> Analytische HPLC-Methode für <b>13h</b> .....	384
<b>Tab. 10.13.</b> Präparative HPLC-Methode für <b>13h</b> .....	385
<b>Tab. 10.14.</b> Gradientensystem zur Durchführung der LC-MS, ESI <sup>+/-</sup> -Messung für <b>13h</b> .....	385
<b>Tab. 10.15.</b> Überblick über die Verbindungen in der Datenbank für die Metabolisierungsstudie.....	387

<b>Tab. 10.16.</b> Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Antikörper für die Metabolisierungsstudie.....	392
<b>Tab. 10.17.</b> Darstellung des klinisch-arthritischen Scores zur Bewertung des Krankheitsgrades.....	395
<b>Tab. 10.18.</b> Bestandteile der EDTA-Lösung.....	398
<b>Tab. 10.19.</b> Histocores zur Bewertung des Krankheitsgrades.....	399
<b>Tab. 10.20.</b> Bestandteile der DMMB-Lösung.....	399
<b>Tab. 10.21.</b> Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Kits für die Mausestudie.....	402

## 11.4 Literaturverzeichnis

1. Annunziato, A. T., DNA Packaging: Nucleosomes and Chromatin. *Nature Education* **2008**, *1* (1).
2. Ettig, R.; Keppler, N.; Stehr, R.; Wedemann, G.; Rippe, K., Dissecting DNA-Histone Interactions in the Nucleosome by Molecular Dynamics Simulations of DNA Unwrapping. *Biophysical Journal* **2011**, *101* (8), 1999-2008.
3. Ververis, K.; Hiong, A.; Karagiannis, T. C.; Licciardi, P. V., Histone deacetylase inhibitors (HDACIs): multitargeted anticancer agents. *Biologics : Targets & Therapy* **2013**, *7*, 47-60.
4. Alan, P. K.; Kyle, V. B., Chemical Origins of Isoform Selectivity in Histone Deacetylase Inhibitors. *Current Pharmaceutical Design* **2008**, *14* (6), 505-528.
5. Weinhold, B., Epigenetics: The Science of Change. *Environmental Health Perspectives* **2006**, *114* (3), A160-A167.
6. Hsu, K.-C.; Liu, C.-Y.; Lin, T. E.; Hsieh, J.-H.; Sung, T.-Y.; Tseng, H.-J.; Yang, J.-M.; Huang, W.-J., Novel Class IIa-Selective Histone Deacetylase Inhibitors Discovered Using an in Silico Virtual Screening Approach. *Scientific Reports* **2017**, *7* (1), 3228.
7. Manfred, J., Inhibitors of Histone Deacetylase as New Anticancer Agents. *Current Medicinal Chemistry* **2001**, *8* (12), 1505-1511.
8. Hess-Stumpp, H.; Bracker, T. U.; Henderson, D.; Politz, O., MS-275, a potent orally available inhibitor of histone deacetylases—The development of an anticancer agent. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2007**, *39* (7), 1388-1405.
9. Brownell, J. E.; Allis, C. D., Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Current Opinion in Genetics & Development* **1996**, *6* (2), 176-184.
10. Seidel, C.; Schnekenburger, M.; Dicato, M.; Diederich, M., Histone deacetylase 6 in health and disease. *Epigenomics* **2015**, *7* (1), 103-118.
11. MacRae Thomas, H., Tubulin Post-Translational Modifications. *European Journal of Biochemistry* **2004**, *244* (2), 265-278.
12. Gu, W.; Roeder, R. G., Activation of p53 Sequence-Specific DNA Binding by Acetylation of the p53 C-Terminal Domain. *Cell* **1997**, *90* (4), 595-606.
13. Wang, X.-X.; Wan, R.-Z.; Liu, Z.-P., Recent advances in the discovery of potent and selective HDAC6 inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *143*, 1406-1418.
14. Philip, J.; Christian, S., From Natural Products to Small Molecule Ketone Histone Deacetylase Inhibitors: Development of New Class Specific Agents. *Current Pharmaceutical Design* **2008**, *14* (6), 545-561.
15. Allfrey, V. G.; Faulkner, R.; Mirsky, A. E., ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1964**, *51* (5), 786-794.
16. Seto, E.; Yoshida, M., Erasers of Histone Acetylation: The Histone Deacetylase Enzymes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2014**, *6* (4), a018713.
17. De Vreese, R.; D'Hooghe, M., Synthesis and applications of benzohydroxamic acid-based histone deacetylase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *135*, 174-195.
18. Huili, P.; Jiangying, C.; Wenfang, X., Selective Histone Deacetylase Inhibitors. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **2012**, *12* (3), 247-270.
19. Wang, D., Computational Studies on the Histone Deacetylases and the Design of Selective Histone Deacetylase Inhibitors. *Current topics in medicinal chemistry* **2009**, *9* (3), 241-256.
20. Daniel, A. R.; Sreekanth, T.; Carlos, A. M. F., Beyond the Selective Inhibition of Histone Deacetylase 6. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2016**, *16* (14), 1175-1184.
21. Chao, S.-C.; Chen, Y.-J.; Huang, K.-H.; Kuo, K.-L.; Yang, T.-H.; Huang, K.-Y.; Wang, C.-C.; Tang, C.-H.; Yang, R.-S.; Liu, S.-H., Induction of sirtuin-1 signaling by resveratrol induces human chondrosarcoma cell apoptosis and exhibits antitumor activity. *Scientific Reports* **2017**, *7* (1), 3180.
22. Li, Y.; Shin, D.; Kwon So, H., Histone deacetylase 6 plays a role as a distinct regulator of diverse cellular processes. *The FEBS Journal* **2012**, *280* (3), 775-793.

23. Aldana-Masangkay, G. I.; Sakamoto, K. M., The Role of HDAC6 in Cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2011**, 2011, 875824.
24. Simões-Pires, C.; Zwick, V.; Nurisso, A.; Schenker, E.; Carrupt, P.-A.; Cuendet, M., HDAC6 as a target for neurodegenerative diseases: what makes it different from the other HDACs? *Molecular Neurodegeneration* **2013**, 8, 7-7.
25. Zhang, Y.; Gilquin, B.; Khochbin, S.; Matthias, P., Two Catalytic Domains Are Required for Protein Deacetylation. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, 281 (5), 2401-2404.
26. Zou, H.; Wu, Y.; Navre, M.; Sang, B.-C., Characterization of the two catalytic domains in histone deacetylase 6. *Biochemical and biophysical research communications* **2006**, 341 (1), 45-50.
27. Lee, J.-H.; Mahendran, A.; Yao, Y.; Ngo, L.; Venta-Perez, G.; Choy, M. L.; Kim, N.; Ham, W.-S.; Breslow, R.; Marks, P. A., Development of a histone deacetylase 6 inhibitor and its biological effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, 110 (39), 15704-15709.
28. Goracci, L.; Deschamps, N.; Randazzo, G. M.; Petit, C.; Dos Santos Passos, C.; Carrupt, P.-A.; Simões-Pires, C.; Nurisso, A., A Rational Approach for the Identification of Non-Hydroxamate HDAC6-Selective Inhibitors. *Scientific Reports* **2016**, 6, 29086.
29. Müller-Esterl, W., *Biochemie; Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, **2004**.
30. Parmigiani, R. B.; Xu, W. S.; Venta-Perez, G.; Erdjument-Bromage, H.; Yaneva, M.; Tempst, P.; Marks, P. A., HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, 105 (28), 9633-9638.
31. Kalin, J. H.; Bergman, J. A., Development and Therapeutic Implications of Selective Histone Deacetylase 6 Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56 (16), 6297-6313.
32. Mottamal, M.; Zheng, S.; Huang, T. L.; Wang, G., Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. *Molecules* **2015**, 20 (3), 3898-941.
33. Mendillo, Marc L.; Santagata, S.; Koeva, M.; Bell, George W.; Hu, R.; Tamimi, Rulla M.; Fraenkel, E.; Ince, Tan A.; Whitesell, L.; Lindquist, S., HSF1 Drives a Transcriptional Program Distinct from Heat Shock to Support Highly Malignant Human Cancers. *Cell* **2012**, 150 (3), 549-562.
34. Abdelkarim, H.; Neelapapu, R.; Madriaga, A.; Vaidya Aditya, S.; Kastrati, I.; Karumudi, B.; Wang, Y. t.; Taha Taha, Y.; Thatcher Gregory, R. J.; Frasier, J.; Petukhov Pavel, A., Design, Synthesis, Molecular Modeling, and Biological Evaluation of Novel Amine-based Histone Deacetylase Inhibitors. *ChemMedChem* **2017**, 12 (24), 2030-2043.
35. Sawa, H.; Murakami, H.; Kumagai, M.; Nakasato, M.; Yamauchi, S.; Matsuyama, N.; Tamura, Y.; Satone, A.; Ide, W.; Hashimoto, I.; Kamada, H., Histone deacetylase inhibitor, FK228, induces apoptosis and suppresses cell proliferation of human glioblastoma cells in vitro and in vivo. *Acta Neuropathologica* **2004**, 107 (6), 523-531.
36. Marks, P. A.; Richon, V. M.; Rifkind, R. A., Histone Deacetylase Inhibitors: Inducers of Differentiation or Apoptosis of Transformed Cells. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **2000**, 92 (15), 1210-1216.
37. Lin, H.-Y.; Chen, C.-S.; Lin, S.-P.; Weng, J.-R.; Chen, C.-S., Targeting histone deacetylase in cancer therapy. *Medicinal Research Reviews* **2006**, 26 (4), 397-413.
38. Yoshida, M.; Kijima, M.; Akita, M.; Beppu, T., Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *Journal of Biological Chemistry* **1990**, 265 (28), 17174-17179.
39. Singh, R. K.; Lall, N.; Leedahl, T. S.; McGillivray, A.; Mandal, T.; Haldar, M.; Mallik, S.; Cook, G.; Srivastava, D. K., Kinetic and Thermodynamic Rationale for Suberoylanilide Hydroxamic Acid Being a Preferential Human Histone Deacetylase 8 Inhibitor As Compared to the Structurally Similar Ligand, Trichostatin A. *Biochemistry* **2013**, 52 (45), 8139-8149.
40. Jung, M.; Brosch, G.; Kölle, D.; Scherf, H.; Gerhäuser, C.; Loidl, P., Amide Analogues of Trichostatin A as Inhibitors of Histone Deacetylase and Inducers of Terminal Cell Differentiation. *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, 42 (22), 4669-4679.

41. Woo, S. H.; Frechette, S.; Khalil, E. A.; Bouchain, G.; Vaisburg, A.; Bernstein, N.; Moradei, O.; Leit, S.; Allan, M.; Fournel, M.; Trachy-Bourget, M.-C.; Li, Z.; Besterman, J. M.; Delorme, D., Structurally Simple Trichostatin A-Like Straight Chain Hydroxamates as Potent Histone Deacetylase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45* (13), 2877-2885.
42. Aysegul, H.; Ferhat, H.; Tomris, O., Natural Product Inhibitors of Histone Deacetylases as New Anticancer Agents. *Current Protein & Peptide Science* **2018**, *19* (3), 333-340.
43. Connolly, R. M.; Rudek, M. A.; Piekarz, R., Entinostat: a promising treatment option for patients with advanced breast cancer. *Future Oncology* **2017**, *13* (13), 1137-1148.
44. Witt, O.; Deubzer, H. E.; Milde, T.; Oehme, I., HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Letters* **2009**, *277* (1), 8-21.
45. Di Micco, S.; Chini, M. G.; Terracciano, S.; Bruno, I.; Riccio, R.; Bifulco, G., Structural basis for the design and synthesis of selective HDAC inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, *21* (13), 3795-3807.
46. Vogl, D. T.; Raje, N. S.; Jagannath, S.; Richardson, P. G.; Hari, P.; Orlowski, R. Z.; Supko, J. G.; Tamang, D.; Yang, M.; Jones, S. S.; Wheeler, C.; Markelewicz, R. J.; Lonial, S., Ricolinostat, the first selective histone deacetylase 6 inhibitor, in combination with bortezomib and dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *Clinical Cancer Research* **2017**.
47. Butler, K. V.; Kalin, J.; Brochier, C.; Vistoli, G.; Langley, B.; Kozikowski, A. P., Rational Design and Simple Chemistry Yield a Superior, Neuroprotective HDAC6 Inhibitor, Tubastatin A. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (31), 10842-10846.
48. Lee, J.; Hong Eun, C.; Jeong, H.; Hwang Ji, W.; Kim, H.; Bae, E. K.; Ahn Joong, K.; Choi, Y. L.; Han, J.; Cha, H. S.; Koh, E. M., A novel histone deacetylase 6-selective inhibitor suppresses synovial inflammation and joint destruction in a collagen antibody-induced arthritis mouse model. *International Journal of Rheumatic Diseases* **2014**, *18* (5), 514-523.
49. Zhang, L.; Zhang, J.; Jiang, Q.; Zhang, L.; Song, W., Zinc binding groups for histone deacetylase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2018**, *33* (1), 714-721.
50. Leonhardt, M.; Sellmer, A.; Krämer, O. H.; Dove, S.; Elz, S.; Kraus, B.; Beyer, M.; Mahboobi, S., Design and biological evaluation of tetrahydro- $\beta$ -carboline derivatives as highly potent histone deacetylase 6 (HDAC6) inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *152*, 329-357.
51. Lin, X.; Chen, W.; Qiu, Z.; Guo, L.; Zhu, W.; Li, W.; Wang, Z.; Zhang, W.; Zhang, Z.; Rong, Y.; Zhang, M.; Yu, L.; Zhong, S.; Zhao, R.; Wu, X.; Wong, J. C.; Tang, G., Design and Synthesis of Orally Bioavailable Aminopyrrolidinone Histone Deacetylase 6 Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *58* (6), 2809-2820.
52. Mai, A.; Massa, S.; Rotili, D.; Pezzi, R.; Bottoni, P.; Scatena, R.; Meraner, J.; Brosch, G., Exploring the connection unit in the HDAC inhibitor pharmacophore model: Novel uracil-based hydroxamates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15* (21), 4656-4661.
53. Hai, Y.; Christianson, D. W., Histone deacetylase 6 structure and molecular basis of catalysis and inhibition. *Nature Chemical Biology* **2016**, *12*, 741.
54. Estiu, G.; Greenberg, E.; Harrison, C. B.; Kwiatkowski, N. P.; Mazitschek, R.; Bradner, J. E.; Wiest, O., Structural Origin of Selectivity in Class II-Selective Histone Deacetylase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51* (10), 2898-2906.
55. Haggarty, S. J.; Koeller, K. M.; Wong, J. C.; Grozinger, C. M.; Schreiber, S. L., Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100* (8), 4389-4394.
56. Dallavalle, S.; Pisano, C.; Zunino, F., Development and therapeutic impact of HDAC6-selective inhibitors. *Biochemical Pharmacology* **2012**, *84* (6), 756-765.
57. Sellmer, A.; Stangl, H.; Beyer, M.; Grunstein, E.; Leonhardt, M.; Pongratz, H.; Eichhorn, E.; Elz, S.; Striegl, B.; Jenei-Lanzl, Z.; Dove, S.; Straub, R. H.; Kramer, O. H.; Mahboobi, S., Marbostat-100 Defines a New Class of Potent and Selective Antiinflammatory and Antirheumatic Histone Deacetylase 6 Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *61* (8), 3454-3477.

58. Ballini, R.; Gabrielli, S.; Palmieri, A.; Petrini, M., Improved preparation of alkyl 2-(3-indolyl)-3-nitroalkanoates under fully heterogeneous conditions: stereoselective synthesis of alkyl (E)-2-(3-indolyl)-2-alkenoates. *Tetrahedron* **2008**, *64* (23), 5435-5441.
59. Pavlov, N.; Gilles, P.; Didierjean, C.; Wenger, E.; Naydenova, E.; Martinez, J.; Calmès, M., Asymmetric Synthesis of  $\beta$ 2-Tryptophan Analogues via Friedel–Crafts Alkylation of Indoles with a Chiral Nitroacrylate. *The Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76* (15), 6116-6124.
60. Seayad, J.; Seayad, A. M.; List, B., Catalytic Asymmetric Pictet–Spengler Reaction. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (4), 1086-1087.
61. Pictet, A.; Spengler, T., Über die Bildung von Isochinolin-derivaten durch Einwirkung von Methylal auf Phenyl-äthylamin, Phenyl-alanin und Tyrosin. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1911**, *44* (3), 2030-2036.
62. Bartoli, G.; Bosco, M.; Giuli, S.; Giuliani, A.; Lucarelli, L.; Marcantoni, E.; Sambri, L.; Torregiani, E., Efficient Preparation of 2-Indolyl-1-nitroalkane Derivatives Employing Nitroalkenes as Versatile Michael Acceptors: New Practical Linear Approach to Alkyl 9H- $\beta$ -Carboline-4-carboxylate. *The Journal of Organic Chemistry* **2005**, *70* (5), 1941-1944.
63. Creemer, L., Camillo; Herrin, J., Rhea; McGruder, E., Deorsey Preparation of piperidine derivatives as immunopotentiator agents. **2001**.
64. Martinez, J.; Oiry, J.; Imbach, J. L.; Winternitz, F., Activated N-nitrosocarbamates for regioselective synthesis of N-nitrosoureas. *Journal of Medicinal Chemistry* **1982**, *25* (2), 178-182.
65. Vo-Hoang, Y.; Gasse, C.; Vidal, M.; Garbay, C.; Galons, H., Efficient synthesis of N-benzyl-3-aminopyrrolidine-2,5-dione and N-benzyl-3-aminopyrrolidin-2-one. *Tetrahedron Letters* **2004**, *45* (18), 3603-3605.
66. Flessner, T.; Doye, S., Cesium carbonate: A powerful inorganic base in organic synthesis. *Journal für praktische Chemie* **1999**, *341* (2), 186-190.
67. Kozikowski, A. P.; Kalin, J. H.; Butler, K. V.; Hancock, W. W. Preparation of 4-substituted N-hydroxybenzamides as HDAC inhibitors and therapeutic methods using them. WO 2012106343A2, **2012**.
68. Witter, D. J.; Belvedere, S.; Chen, L.; Secrist, J. P.; Mosley, R. T.; Miller, T. A., Benzo[b]thiophene-based histone deacetylase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17* (16), 4562-4567.
69. Mérour, J. Y.; Cossais, F., Regioselective N-Alkylation of Methyl Indole-2-carboxylate. *Synthetic Communications* **1993**, *23* (13), 1813-1820.
70. Huo, H.; Fu, C.; Harms, K.; Meggers, E., Asymmetric Catalysis with Substitutionally Labile yet Stereochemically Stable Chiral-at-Metal Iridium(III) Complex. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (8), 2990-2993.
71. Motoshima, K.; Ishikawa, M.; Hashimoto, Y.; Sugita, K., Peroxisome proliferator-activated receptor agonists with phenethylphenylphthalimide skeleton derived from thalidomide-related liver X receptor antagonists: Relationship between absolute configuration and subtype selectivity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19* (10), 3156-3172.
72. Adams, C. H., Q.-Y.; McGuire, L. W.; Papillon, J. Preparation of Pyridinylindole Derivatives for Use as Aldosterone Synthase Modulators. WO2009156462, December 30, **2009**.
73. Baer, T. M., T.; Beckers, T.; Ciossek, T.; Mahboobi, S.; Sellmer, A. Novel Bifunctional Compounds which inhibit Protein Kinases and Histone Deacetylases. WO2009063054A1, May 22, **2009**.
74. Mahboobi, S.; Sellmer, A.; Höcher, H.; Garhammer, C.; Pongratz, H.; Maier, T.; Ciossek, T.; Beckers, T., 2-Aroylindoles and 2-Aroylbenzofurans with N-Hydroxyacrylamide Substructures as a Novel Series of Rationally Designed Histone Deacetylase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50* (18), 4405-4418.
75. Lainton, J. A. H.; Allen, M. C.; Burton, M.; Cameron, S.; Edwards, T. R. G.; Harden, G.; Hogg, R.; Leung, W.; Miller, S.; Morrish, J. J.; Rooke, S. M.; Wendt, B., Design and Synthesis of A Diverse Morpholine Template Library. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2003**, *5* (4), 400-407.
76. El-Faham, A.; Albericio, F., Morpholine-Based Immonium and Halogenoamidinium Salts as Coupling Reagents in Peptide Synthesis<sup>1</sup>. *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73* (7), 2731-2737.

77. Frederick; J.; Brown; Ying K. Yee; Laura; A.; Cronk, K.; C.; Hebbel; Robert; D.; Krell; and; David; W.; Snyder, Evolution of a Series of Peptidoleukotriene Antagonists: Synthesis and Structure-Activity Relationships of 1,6 Disubstituted Indoles and Indazoles. *J. Med. Chem* **1990**, *33*, 1771-1781.
78. Jorapur, Y. R.; Jeong, J. M.; Chi, D. Y., Potassium carbonate as a base for the N-alkylation of indole and pyrrole in ionic liquids. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47* (14), 2435-2438.
79. Mahboobi, S.; Sellmer, A.; Pongratz, H.; Leonhardt, M.; Krämer, O. H.; Böhmer, F.-D.; Kelter, G. Novel HDAC6 Inhibitors and their uses. WO2016020369A1, **2016**.
80. Vilsmeier, A.; Haack, A., Über die Einwirkung von Halogenphosphor auf Alkyl-formanilide. Eine neue Methode zur Darstellung sekundärer und tertiärer p-Alkylamino-benzaldehyde. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1927**, *60* (1), 119-122.
81. Zhang, C.; Xu, D.; Wang, J.; Kang, C., Efficient Synthesis and Biological Activity of Novel Indole Derivatives as VEGFR-2 Tyrosine Kinase Inhibitors. *Russian Journal of General Chemistry* **2017**, *87* (12), 3006-3016.
82. Louis, H., Nitro-alcohols. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences* **1895**, *121*, 210-213.
83. Ranganathan, D.; Rao, C. B.; Ranganathan, S.; Mehrotra, A. K.; Iyengar, R., Nitroethylene: a stable, clean, and reactive agent for organic synthesis. *The Journal of Organic Chemistry* **1980**, *45* (7), 1185-1189.
84. Spadoni, G.; Balsamini, C.; Bedini, A.; Diamantini, G.; Di Giacomo, B.; Tontini, A.; Tarzia, G.; Mor, M.; Plazzi, P. V.; Rivara, S.; Nonno, R.; Pannacci, M.; Lucini, V.; Frascini, F.; Stankov, B. M., 2-[N-Acylamino(C1-C3)alkyl]indoles as MT1 Melatonin Receptor Partial Agonists, Antagonists, and Putative Inverse Agonists. *Journal of Medicinal Chemistry* **1998**, *41* (19), 3624-3634.
85. Gairaud, C. B.; Lappin, G. R., THE SYNTHESIS OF -NITROSTYRENES. *The Journal of Organic Chemistry* **1953**, *18* (1), 1-3.
86. Vo, Q. V.; Trenerry, C.; Rochfort, S.; Wadeson, J.; Leyton, C.; Hughes, A. B., Synthesis and anti-inflammatory activity of aromatic glucosinolates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, *21* (19), 5945-5954.
87. Manna, M. S.; Mukherjee, S., Organocatalytic Enantioselective Formal C(sp<sup>2</sup>)-H Alkylation. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137* (1), 130-133.
88. Cox, E. D.; Cook, J. M., The Pictet-Spengler condensation: a new direction for an old reaction. *Chemical Reviews* **1995**, *95* (6), 1797-1842.
89. Mortimer, C. E., *Das Basiswissen der Chemie*. 5. Auflage; Georg Thieme Verlag Stuttgart, **1987**.
90. Shi, X.-X.; Liu, S.-L.; Xu, W.; Xu, Y.-L., Highly stereoselective Pictet-Spengler reaction of d-tryptophan methyl ester with piperonal: convenient syntheses of Cialis (Tadalafil), 12a-epi-Cialis, and their deuterated analogues. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19* (4), 435-442.
91. Xiao, S.; Shi, X. X.; Ni, F.; Xing, J.; Yan, J. J.; Liu, S. L., An Efficient and General Method for the Stereodivergent Syntheses of Tadalafil-Like Tetracyclic Compounds. *European Journal of Organic Chemistry* **2010**, *2010* (9), 1711-1716.
92. Siddiqui, S. A.; Narkhede, U. C.; Lahoti, R. J.; Srinivasan, K. V., Enantioselective Synthesis of (+)-(S,S)-Reboxetine. *Synlett* **2006**, *2006* (11), 1771-1773.
93. Brenner, E.; Baldwin, R. M.; Tamagnan, G., Asymmetric Synthesis of (+)-(S,S)-Reboxetine via a New (S)-2-(Hydroxymethyl)morpholine Preparation. *Organic Letters* **2005**, *7* (5), 937-939.
94. Lingam, Y.; Rao, D. M.; Rao, J. S.; Venu, B. K.; Mohammed, A. K.; Kumar, G. S.; A., I., A facile synthesis  $\beta$ -carboline and studies on their antimicrobial activities. *Indian J. Org. Chem.* **2008**, *4* (1), 28-31.
95. Schneider, G.; Neidhart, W.; Giller, T.; Schmid, G., "Scaffold-Hopping" by Topological Pharmacophore Search: A Contribution to Virtual Screening. *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, *38* (19), 2894-2896.
96. Sun, H.; Tawa, G.; Wallqvist, A., Classification of scaffold-hopping approaches. *Drug Discovery Today* **2012**, *17* (7), 310-324.
97. Hu, Y.; Stumpfe, D.; Bajorath, J., Recent Advances in Scaffold Hopping. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60* (4), 1238-1246.



98. Böhm, H.-J.; Flohr, A.; Stahl, M., Scaffold hopping. *Drug Discovery Today: Technologies* **2004**, 1 (3), 217-224.
99. Siebert Carsten, D., Das Bioisosterie-Konzept: Arzneistoffentwicklung. *Chemie in unserer Zeit* **2004**, 38 (5), 320-324.
100. Bemis, G. W.; Murcko, M. A., The Properties of Known Drugs. 1. Molecular Frameworks. *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, 39 (15), 2887-2893.
101. Guzman, F. C., M.; Larscheid, P.; Hagen, T.; Cook, J. M.; Schweri, M.; Skolnick, P.; Paul, S.M., Biomimetic Approach to Potential Benzodiazepine Receptor Agonists and Antagonists. *The Journal of Medicinal Chemistry* **1984**, 27 (5), 564-570.
102. Smolyar, N. N.; Abramyan, M. G.; Zavyazkina, T. I.; Matveeva, D. I.; Borodkin, Y. S.; Voloskii, I. A., Synthesis and dehydrogenation of spinaceamine and spinacine 4-hetaryl derivatives. *Russian Journal of Organic Chemistry* **2009**, 45 (8), 1219-1223.
103. Dress, K. P. H., Q.; Johnson, T. W.; Plewe, M. B.; Tanis, S.P.; Wang, H.; Yang, A.; Yin, C.; Zhang, J. Pyrrolopyridine Derivatives and Their Use as HIV-Integrase Inhibitors. WO 2005103003A3, November 3, **2005**.
104. Büchel, K. H.; Falbe, J.; Hagemann, H.; Hanack, M.; Klamann, D.; Kreher, R.; Kropf, H.; Regitz, M.; Schaumann, E., *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*. 4. Auflage; Thieme Verlag: **2002**; Vol. E 22a.
105. Braña, M. F.; Guisado, C.; Pérez-Castells, J.; Pérez-Serrano, L., Synthesis of 4,7,8a,9-tetrahydro-3H-diimidazo-[1,5-a:4',5'-d]pyridine derivatives. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2002**, 39 (2), 417-420.
106. Jeener, J.; Meier, B. H.; Bachmann, P.; Ernst, R. R., Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *The Journal of Chemical Physics* **1979**, 71 (11), 4546-4553.
107. Neuhaus, D.; Williamson, M. P., *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*. 2; Wiley-VCH, **2000**.
108. Friebolin, H., *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: Eine Einführung*. Wiley-VCH, Weinheim, **2013**; Vol. 1. Aufl.
109. Claridge, T. D. W., Chapter 13 - Structure Elucidation and Spectrum Assignment. In *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry (Third Edition)*, Claridge, T. D. W., Ed. Elsevier: Boston, **2016**; pp 499-525.
110. Chary, K. V. R.; Modi, S., Analysis of intrasugar interproton NOESY cross-peaks as an aid to determine sugar geometries in DNA fragments. *FEBS Letters* **1988**, 233 (2), 319-325.
111. Crosby, J., Synthesis of optically active compounds: A large scale perspective. *Tetrahedron* **1991**, 47 (27), 4789-4846.
112. Bertau, M.; Bürl, M., Enantioselective Microbial Reduction with Baker's Yeast on an Industrial Scale. *CHIMIA International Journal for Chemistry* **2000**, 54 (9), 503-507.
113. Wolfson, A.; Christina, D.; Tavor, D., Baker's yeast catalyzed asymmetric reduction of prochiral ketones in different reaction mediums. *Org. Commun.* **2013**, 6 (1), 1-11.
114. Houn, J.-Y.; Hsu, H.-F.; Liu, Y.-H.; Wu, J.-Y., Applying the Taguchi robust design to the optimization of the asymmetric reduction of ethyl 4-chloro acetoacetate by bakers' yeast. *Journal of Biotechnology* **2003**, 100 (3), 239-250.
115. Johanson, T.; Katz, M.; Gorwa-Grauslund, M. F., Strain engineering for stereoselective bioreduction of dicarbonyl compounds by yeast reductases. *FEMS Yeast Research* **2005**, 5, 513-525.
116. Liu, Y.; Wang, Y.; Chen, X.; Wu, Q.; Wang, M.; Zhu, D.; Ma, Y., Regio- and stereoselective reduction of 17-oxosteroids to 17 $\beta$ -hydroxysteroids by a yeast strain *Zygowillipsia* sp. WY7905. *Steroids* **2017**, 118, 17-24.
117. Turner, N. J.; O'Reilly, E., Biocatalytic retrosynthesis. *Nature Chemical Biology* **2013**, 9, 285.
118. Rajagopal, G.; Kim, S. S., Synthesis of  $\alpha$ -aryl nitriles through B(C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>)<sub>3</sub>-catalyzed direct cyanation of  $\alpha$ -aryl alcohols and thiols. *Tetrahedron* **2009**, 65 (22), 4351-4355.
119. Theerthagiri, P.; Lalitha, A., Zn(OTf)<sub>2</sub>—catalyzed direct cyanation of benzylic alcohols—a novel synthesis of  $\alpha$ -aryl nitriles. *Tetrahedron Letters* **2012**, 53 (41), 5535-5538.
120. Thakur, V. V.; Sudalai, A., Enantioselective synthesis of (S)- $\alpha$ -arylpropionic acids via Pd-catalyzed kinetic resolution of benzylic alcohols *Indian Journal of Chemistry* **2005**, 44B, 557-562.

121. Chen, G.; Wang, Z.; Wu, J.; Ding, K., Facile Preparation of  $\alpha$ -Aryl Nitriles by Direct Cyanation of Alcohols with TMSCN Under the Catalysis of  $\text{InX}_3$ . *Organic Letters* **2008**, 10 (20), 4573-4576.
122. Kandula, M. Prodrugs of GABA analogs, their preparation, therapeutics use and pharmaceutical compositions containing them. WO2013008182A1, **2013**.
123. Salvati, M. E.; Johnson, J. A.; Xu, N. N- (3-benzyl) -2, 2- (bis-phenyl) -propan-1-amine derivatives as cetylinhibitors for the treatment of atherosclerosis and cardiovascular diseases WO 2008070496 A2, **2008**.
124. Tallant, M. D.; Duan, M.; Freeman, G. A.; Ferris, R. G.; Edelstein, M. P.; Kazmierski, W. M.; Wheelan, P. J., Synthesis and evaluation of 2-phenyl-1,4-butanediamine-based CCR5 antagonists for the treatment of HIV-1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, 21 (5), 1394-1398.
125. Safdy, M. E.; Kurchacova, E.; Schut, R. N.; Vidrio, H.; Hong, E., Tryptophan analogs. 1. Synthesis and antihypertensive activity of positional isomers. *Journal of Medicinal Chemistry* **1982**, 25 (6), 723-730.
126. Wei, Z.-L.; Li, Z.-Y.; Lin, G.-Q., Baker's yeast mediated mono-reduction of 1,3-cyclohexanediones bearing two identical C(2) substituents. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, 12 (2), 229-233.
127. Mo, K.; Kang Soon, B.; Kim, Y.; Lee Yong, S.; Lee Jae, W.; Keum, G., Chemo- and Stereoselective Reduction of  $\beta$ -Keto- $\alpha$ -oximino Nitriles by Using Baker's Yeast. *European Journal of Organic Chemistry* **2014**, 2015 (5), 1137-1143.
128. Lopchuk, J. M.; Green, I. L.; Badenock, J. C.; Gribble, G. W., A Short, Protecting Group-Free Total Synthesis of Bruceollines D, E, and J. *Organic Letters* **2013**, 15 (17), 4485-4487.
129. McKelvey, R. D., Stereochemistry of Organic Compounds ( Eliel, Ernest L.; Wilen, Samuel H.). *Journal of Chemical Education* **1996**, 73 (8), A174.
130. Kropf, H., D. Enantiomeren-Trennung (Racemat-Spaltung). In *Alkohole*, 4th Edition; Kropf, H., Ed. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, **1984**; Vol. VI/1b.
131. Houben-Weyl, *Methoden der organischen Chemie*. 4; Georg Thieme Verlag Stuttgart, **1984**; Vol. VI/1b.
132. Altermann Sabine, M.; Richardson Robert, D.; Page, T. K.; Schmidt Ruth, K.; Holland, E.; Mohammed, U.; Paradine Shauna, M.; French Andrew, N.; Richter, C.; Bahar, A. M.; Witulski, B.; Wirth, T., Catalytic Enantioselective  $\alpha$ -Oxysulfonylation of Ketones Mediated by Iodoarenes. *European Journal of Organic Chemistry* **2008**, 2008 (31), 5315-5328.
133. Krasik, P., Synthesis of sterically hindered esters via titanium catalyzed transesterification. *Tetrahedron Letters* **1998**, 39 (24), 4223-4226.
134. Cao, Z.; Beppino, G. Aromatic Esters of Camptothecins and methods to treat cancers. **2001**.
135. Ganesh, M.; Seidel, D., Catalytic Enantioselective Additions of Indoles to Nitroalkenes. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130 (49), 16464-16465.
136. Thiel, W. M., R., Dithiocarbonsäuren, Dithiocarbonsäureester oder Thiocarbonsäureamide aus methylenaktiven Chlormethylverbindungen und Schwefel. *Journal f.prakt.Chemie* **1989**, Band 331 (Heft 2), 243-262.
137. Pritchard, R. G.; Stoodley, R. J.; Yuen, W. H., Studies related to carba-pyranoses: synthesis of acetylated derivatives of 4-amino-2,4-dideoxy-3-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl)- $\beta$ -D-L-(and  $\beta$ -D-) altrocarba-pyranose from a D-glucose template. *Org Biomol Chem* **2005**, 3 (1), 162-71.
138. Högborg, T. S., P.; Ebner, M.; Rämby, S., Cyanide as an efficient and Mild Catalyst in the Aminolysis of Esters. *Journal of Organic Chemistry* **1987**, 52 (10), 2033-2036.
139. Matsumoto, K.; Hashimoto, S.; Otani, S., Direkte Aminolyse von nicht aktivierten Estern bei hohem Druck. *Angewandte Chemie* **1986**, 98 (6), 569-570.
140. Zhang, D.; Xing, X.; Cuny, G. D., Synthesis of Hydantoins from Enantiomerically Pure  $\alpha$ -Amino Amides without Epimerization. *The Journal of Organic Chemistry* **2006**, 71 (4), 1750-1753.
141. Pal, R.; Sarkar, T.; Khasnabis, S., Amberlyst-15 in organic synthesis. *ARKIVOC* **2012**, 570-609.
142. Lankhorst, P.; van Rijn, J.; Duchateau, A., One-Dimensional  $^{13}\text{C}$  NMR Is a Simple and Highly Quantitative Method for Enantiodiscrimination. *Molecules* **2018**, 23 (7).

143. Pirkle, W. H.; Sikkenga, D. L.; Pavlin, M. S., Nuclear magnetic resonance determination of enantiomeric composition and absolute configuration of  $\gamma$ -lactones using chiral 2,2,2-trifluoro-1-(9-anthryl)ethanol. *The Journal of Organic Chemistry* **1977**, 42 (2), 384-387.
144. Friebolin, H., *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: Eine Einführung*. 5. Aufl.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2013**.
145. Bijvoet, J. M.; Peerdeman, A. F.; van Bommel, A. J., Determination of the Absolute Configuration of Optically Active Compounds by Means of X-Rays. *Nature* **1951**, 168, 271.
146. Hooft Rob, W. W.; Straver Leo, H.; Spek Anthony, L., Determination of absolute structure using Bayesian statistics on Bijvoet differences. *Journal of Applied Crystallography* **2008**, 41 (1), 96-103.
147. Eliel, E. L.; Wilen, S. H.; Allinger, N. L., *Topics in Stereochemistry*. John Wiley and Sons, 1986.
148. Flack, H. D.; Bernardinelli, G., The use of X-ray crystallography to determine absolute configuration. *Chirality* **2007**, 20 (5), 681-690.
149. Schlesinger, C.; Tapmeyer, L.; Gumbert Silke, D.; Prill, D.; Bolte, M.; Schmidt Martin, U.; Saal, C., Bestimmung der absoluten Konfiguration pharmazeutischer Wirkstoffe durch Röntgenpulverdiffraktometrie. *Angewandte Chemie* **2018**, 130 (29), 9289-9293.
150. Bock, D. A.; Lehmann, C. W., Chirality determination from X-ray powder data—diastereomeric co-crystals of mandelic acid and proline amide. *CrystEngComm* **2012**, 14 (5), 1534-1537.
151. Flack, H. D.; Bernardinelli, G., Absolute structure and absolute configuration. *Acta Cryst.* **1999**, A55, 908-915.
152. Gärtner, S.; Universität Regensburg, Schriftliche Mitteilung [Email]. 26.7.2018.
153. Spek, A. L., The anticholinergic drug dexetimide. The crystal structure and absolute configuration of (+)-1-benzyl-4-(2,6-dioxo-3-phenyl-3-piperidyl)piperidine hydrobromide hemihydrate. *Acta Crystallographica Section B* **1976**, 32 (3), 870-877.
154. Anwer, M. K.; Sherman, D.; Roney, J. G.; Spatola, A. F., Applications of ammonium formate catalytic transfer hydrogenation. 6. Analysis of catalyst, donor quantity, and solvent effects upon the efficacy of dechlorination. *The Journal of Organic Chemistry* **1989**, 54 (6), 1284-1289.
155. Nikolic, K.; Mavridis, L.; Djikic, T.; Vucicevic, J.; Agbaba, D.; Yelekci, K.; Mitchell, J. B. O., Drug Design for CNS Diseases: Polypharmacological Profiling of Compounds Using Cheminformatic, 3D-QSAR and Virtual Screening Methodologies. *Frontiers in Neuroscience* **2016**, 10, 265.
156. Ramsay, R. R.; Tipton, K. F., Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase Inhibitory Drugs. *Molecules* **2017**, 22 (7).
157. Yung-Chi, C.; Prusoff, W. H., Relationship between the inhibition constant (K<sub>i</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology* **1973**, 22 (23), 3099-3108.
158. Brandt, R. B.; Laux, J. E.; Yates, S. W., Calculation of inhibitor K<sub>i</sub> and inhibitor type from the concentration of inhibitor for 50% inhibition for Michaelis-Menten enzymes. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology* **1987**, 37 (3), 344-349.
159. Burlingham, B. T.; Widlanski, T. S., An Intuitive Look at the Relationship of K<sub>i</sub> and IC<sub>50</sub>: A More General Use for the Dixon Plot. *Journal of Chemical Education* **2003**, 80 (2), 214.
160. Smart, R. C.; Hodgson, E., *Molecular and biochemical Toxicology*. John Wiley & Sons, **2017**.
161. Zhang, L.; Han, Y.; Jiang, Q.; Wang, C.; Chen, X.; Li, X.; Xu, F.; Jiang, Y.; Wang, Q.; Xu, W., Trend of Histone Deacetylase Inhibitors in Cancer Therapy: Isoform Selectivity or Multitargeted Strategy. *Medicinal Research Reviews* **2014**, 35 (1), 63-84.
162. Bieliauskas, A. V.; Pflum, M. K., H., Isoform-selective histone deacetylase inhibitors. *Chem.Soc.Rev.* **2008**, 37, 1402-1413.
163. Bergman, J. A.; Woan, K.; Perez-Villarroel, P.; Villagra, A.; Sotomayor, E. M.; Kozikowski, A. P., Selective Histone Deacetylase 6 Inhibitors Bearing Substituted Urea Linkers Inhibit Melanoma Cell Growth. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 55 (22), 9891-9899.
164. Lobera, M.; Madauss, K. P.; Pohlhaus, D. T.; Wright, Q. G.; Trocha, M.; Schmidt, D. R.; Baloglu, E.; Trump, R. P.; Head, M. S.; Hofmann, G. A.; Murray-Thompson, M.; Schwartz, B.; Chakravorty, S.;

- Wu, Z.; Mander, P. K.; Kruidenier, L.; Reid, R. A.; Burkhart, W.; Turunen, B. J.; Rong, J. X.; Wagner, C.; Moyer, M. B.; Wells, C.; Hong, X.; Moore, J. T.; Williams, J. D.; Soler, D.; Ghosh, S.; Nolan, M. A., Selective class IIa histone deacetylase inhibition via a nonchelating zinc-binding group. *Nature Chemical Biology* **2013**, *9*, 319.
165. Jolly, J., Sur la durée de la vie et de la multiplication des cellules animales en dehors de l'organisme. *Comptes rendues des Séances de la Société de Biologie* **1903**, *55*, 1266-1267.
166. Dietel, M.; Arps, H.; Gerding, D.; Trapp, M.; Niendorf, A., Establishment of primary cell cultures: Experiences with 155 cell strains. *Klinische Wochenschrift* **1987**, *65* (11), 507-512.
167. Kretzmer, G., Industrial processes with animal cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2002**, *59* (2), 135-142.
168. Freshney, R., *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, Sixth Edition*. **2010**; Vol. 346, p 796.
169. Schmitz, S., *Der Experimentator: Zellkultur*. Springer Verlag, **2009**.
170. Cooper, G., M., *The Cell: A molecular approach*. Sinauer Associates, **2000**; Vol. 2. Auflage.
171. Helm, M.; Wölfl, S., *Instrumentelle Bioanalytik*. Wiley-Verlag, **2007**; Vol. 1. Auflage.
172. C Crowley, L.; Chojnowski, G.; Waterhouse, N., *Measuring the DNA Content of Cells in Apoptosis and at Different Cell-Cycle Stages by Propidium Iodide Staining and Flow Cytometry*. **2016**; Vol. 2016, p 905-910.
173. Mahmood, T.; Yang, P.-C., Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences* **2012**, *4* (9), 429-434.
174. Beyer, M.; Kiweler, N.; Mahboobi, S.; Krämer, O. H., How to Distinguish Between the Activity of HDAC1-3 and HDAC6 with Western Blot. In *HDAC/HAT Function Assessment and Inhibitor Development: Methods and Protocols*, Krämer, O. H., Ed. Springer New York: New York, NY, **2017**; pp 355-364.
175. Laemmli, U. K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680.
176. Espallergues, J.; Teegarden, S. L.; Veerakumar, A.; Boulden, J.; Challis, C.; Jochems, J.; Chan, M.; Petersen, T.; Deneris, E.; Matthias, P.; Hahn, C.-G.; Lucki, I.; Beck, S. G.; Berton, O., HDAC6 Regulates Glucocorticoid Receptor Signaling in Serotonin Pathways with Critical Impact on Stress Resilience. *The Journal of Neuroscience* **2012**, *32* (13), 4400.
177. Li, Y.; Zhang, X.; Polakiewicz, R. D.; Yao, T.-P.; Comb, M. J., HDAC6 Is Required for Epidermal Growth Factor-induced  $\beta$ -Catenin Nuclear Localization. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283* (19), 12686-12690.
178. Iaconelli, J.; Lalonde, J.; Watmuff, B.; Liu, B.; Mazitschek, R.; Haggarty, S. J.; Karmacharya, R., Lysine Deacetylation by HDAC6 Regulates the Kinase Activity of AKT in Human Neural Progenitor Cells. *ACS Chemical Biology* **2017**, *12* (8), 2139-2148.
179. Krämer, O. H.; Mahboobi, S.; Sellmer, A., Drugging the HDAC6–HSP90 interplay in malignant cells. *Trends in Pharmacological Sciences* **2014**, *35* (10), 501-509.
180. Bolden, J. E.; Peart, M. J.; Johnstone, R. W., Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery* **2006**, *5*, 769.
181. Boyault, C.; Sadoul, K.; Pabion, M.; Khochbin, S., HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. *Oncogene* **2007**, *26*, 5468.
182. Hu, E.; Dul, E.; Sung, C.-M.; Chen, Z.; Kirkpatrick, R.; Zhang, G.-F.; Johanson, K.; Liu, R.; Lago, A.; Hofmann, G.; Macarron, R.; De Los Frailes, M.; Perez, P.; Krawiec, J.; Winkler, J.; Jaye, M., Identification of Novel Isoform-Selective Inhibitors within Class I Histone Deacetylases. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2003**, *307* (2), 720.
183. Suzuki, T.; Ando, T.; Tsuchiya, K.; Nakanishi, T.; Saito, A.; Yamashita, S.; Shiraishi, G.; Tanaka, E. Preparation of Benzamide Derivatives as Anticancer Agents. CA1998366902, **1998**.
184. Beyer, M.; Universitätsklinikum Mainz, Schriftliche Mitteilung. 2018.
185. Buchwald, M.; Pietschmann, K.; Müller, J. P.; Böhmer, F. D.; Heinzl, T.; Krämer, O. H., Ubiquitin conjugase UBCH8 targets active FMS-like tyrosine kinase 3 for proteasomal degradation. *Leukemia* **2010**, *24*, 1412.
186. OECD, *Test No. 105: Water Solubility*. **1995**.

187. DeAngelo, D. J.; Spencer, A.; Bhalla, K. N.; Prince, H. M.; Fischer, T.; Kindler, T.; Giles, F. J.; Scott, J. W.; Parker, K.; Liu, A.; Woo, M.; Atadja, P.; Mishra, K. K.; Ottmann, O. G., Phase Ia/II, two-arm, open-label, dose-escalation study of oral panobinostat administered via two dosing schedules in patients with advanced hematologic malignancies. *Leukemia* **2013**, *27*, 1628.
188. Oh, B. R.; Suh, D.-h.; Bae, D.; Ha, N.; Choi, Y. I.; Yoo, H. J.; Park, J. K.; Lee, E. Y.; Lee, E. B.; Song, Y. W., Therapeutic effect of a novel histone deacetylase 6 inhibitor, CKD-L, on collagen-induced arthritis in vivo and regulatory T cells in rheumatoid arthritis in vitro. *Arthritis Research & Therapy* **2017**, *19* (1), 154.
189. Ormerod, M. G., Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* **2002**, *265* (1), 73-80.
190. Schutte, B.; Nuydens, R.; Geerts, H.; Ramaekers, F., Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells. *Journal of Neuroscience Methods* **1998**, *86*, 63-69.
191. Patil, P. S., Drug Discovery and ADMET process: a review. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences* **2016**, *3* (7), 181-192.
192. Wan, H., What ADME tests should be conducted for preclinical studies? *Admet & Dmpk* **2013**, *1* (3).
193. Chiu, S.-H. L., The use of in vitro metabolism studies in the understanding of new drugs. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **1993**, *29* (2), 77-83.
194. Meyer, U. A., Overview of enzymes of drug metabolism. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* **1996**, *24* (5), 449-459.
195. Li, A. P., Preclinical in vitro screening assays for drug-like properties. *Drug Discovery Today: Technologies* **2005**, *2* (2), 179-185.
196. Foti, R. S.; Dalvie, D. K., Cytochrome P450 and Non-Cytochrome P450 Oxidative Metabolism: Contributions to the Pharmacokinetics, Safety, and Efficacy of Xenobiotics. *Drug Metabolism and Disposition* **2016**, *44* (8), 1229.
197. Asha, S.; Vidyavathi, M., Role of Human Liver Microsomes in In Vitro Metabolism of Drugs—A Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2010**, *160* (6), 1699-1722.
198. Dudda, A.; Kuerzel, G. U., Metabolism Studies In Vitro and In Vivo. In *Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays*, Vogel, H. G.; Maas, J.; Hock, F. J.; Mayer, D., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2013**; pp 1053-1094.
199. FDA, In Vitro Metabolism- and Transporter- Mediated Drug-Drug Interaction Studies; Guidance for Industry. 2017.
200. Gillette James, R., Factors Affecting Drug Metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2006**, *179* (1), 43-66.
201. Jancova, P.; Anzenbacher, P.; Anzenbacherova, E., Phase 2 drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **2010**, *154* (2), 103-116.
202. Furge Laura, L.; Guengerich, F. P., Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism and chemical toxicology: An introduction. *Biochemistry and Molecular Biology Education* **2006**, *34* (2), 66-74.
203. Brandon, E. F. A.; Raap, C. D.; Meijerman, I.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M., An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2003**, *189* (3), 233-246.
204. Zanger, U. M.; Schwab, M., Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics* **2013**, *138* (1), 103-141.
205. Conney, A. H., Induction of microsomal cytochrome P-450 enzymes: The first Bernard B. Brodie lecture at Pennsylvania State University. *Life Sciences* **1986**, *39* (26), 2493-2518.
206. Jia, L.; Liu, X., The Conduct of Drug Metabolism Studies Considered Good Practice (II): In Vitro Experiments. *Current drug metabolism* **2007**, *8* (8), 822-829.
207. Beedham, C., The role of non-P450 enzymes in drug oxidation. *Pharmacy World and Science* **1997**, *19* (6), 255-263.
208. Williams, J. A.; Hyland, R.; Jones, B. C.; Smith, D. A.; Hurst, S.; Goosen, T. C.; Peterkin, V.; Koup, J. R.; Ball, S. E., DRUG-DRUG INTERACTIONS FOR UDP-GLUCURONOSYLTRANSFERASE

- SUBSTRATES: A PHARMACOKINETIC EXPLANATION FOR TYPICALLY OBSERVED LOW EXPOSURE (AUC<sub>sub</sub>>AUC) RATIOS. *Drug Metabolism and Disposition* **2004**, 32 (11), 1201.
209. Peng, L.; Zhong, X., Epigenetic regulation of drug metabolism and transport. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2015**, 5 (2), 106-112.
  210. Wu, Q.; Zhang, Q.; Wen, C.; Hu, L.; Wang, X.; Lin, G., The effect of MS-275 on CYP450 isoforms activity in rats by cocktail method. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* **2015**, 8 (8), 9360-9367.
  211. Parmentier, Y.; Bossant, M. J.; Bertrand, M.; Walther, B., 5.10 - In Vitro Studies of Drug Metabolism A2 - Taylor, John B. In *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, Triggler, D. J., Ed. Elsevier: Oxford, **2007**; pp 231-257.
  212. Kim, H. M.; Oh, S. J.; Park, S. K.; Han, G.; Kim, K.; Lee, K. S.; Kang, J. S.; Nam, M.; Lee, K., In vitro metabolism of KBH-A40, a novel  $\delta$ -lactam-based histone deacetylase (HDAC) inhibitor, in human liver microsomes and serum. *Xenobiotica* **2008**, 38 (3), 281-293.
  213. Yan, Z.; Caldwell, G. W., Metabolic assessment in liver microsomes by co-activating cytochrome P450s and UDP-glycosyltransferases. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **2003**, 28 (3), 223-232.
  214. Fisher, M. B.; Campanale, K.; Ackermann, B. L.; VandenBranden, M.; Wrighton, S. A., In Vitro Glucuronidation Using Human Liver Microsomes and The Pore-Forming Peptide Alamethicin. *Drug Metabolism and Disposition* **2000**, 28 (5), 560.
  215. Fisher, M. B.; Jackson, D.; Kaerner, A.; Wrighton, S. A.; Borel, A. G., Characterization by Liquid Chromatography-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry of Two Coupled Oxidative-Conjugative Metabolic Pathways for 7-Ethoxycoumarin in Human Liver Microsomes Treated with Alamethicin. *Drug Metabolism and Disposition* **2002**, 30 (3), 270.
  216. Tamura, M.; Yoshida, S.; Tamura, T.; Saitoh, T.; Takeshita, M., Effect of divalent cations on NADH-dependent and NADPH-dependent cytochrome b5 reduction by hepatic microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1990**, 280 (2), 313-319.
  217. Price, R. J.; Renwick, A. B.; Beamand, J. A.; Esclangon, F.; Wield, P. T.; Walters, D. G.; Lake, B. G., Comparison of the metabolism of 7-ethoxycoumarin and coumarin in precision-cut rat liver and lung slices. *Food and Chemical Toxicology* **1995**, 33 (3), 233-237.
  218. Paterson, P.; Fry, J. R.; Horner, S. A., Influence of cytochrome P-450 type on the pattern of conjugation of 7-hydroxycoumarin generated from 7-alkoxycoumarins. *Xenobiotica* **1984**, 14 (11), 849-859.
  219. Barr, J.; Weir, A. J.; Brendel, K.; Sipes, I. G., Liver slices in dynamic organ culture. II. An in vitro cellular technique for the study of integrated drug metabolism using human tissue. *Xenobiotica* **1991**, 21 (3), 341-350.
  220. Elaut, G.; Török, G.; Vinken, M.; Laus, G.; Papeleu, P.; Tourwe, D.; Rogiers, V., Major Phase I Biotransformation Pathways of Trichostatin A in Rat Hepatocytes and in Rat and Human Liver Microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* **2002**, 30 (12), 1320.
  221. Patil, P. G.; Kamble, S. H.; Shah, T. S.; Iyer, K. R., Effect of Water Miscible Organic Solvents on p-Nitrophenol Hydroxylase (CYP2E1) Activity in Rat Liver Microsomes. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2015**, 77 (3), 283-289.
  222. Vuppugalla, R.; Chang, S.-Y.; Zhang, H.; Marathe, P. H.; Rodrigues, D. A., Effect of Commonly Used Organic Solvents on the Kinetics of Cytochrome P450 2B6- and 2C8-Dependent Activity in Human Liver Microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* **2007**, 35 (11), 1990.
  223. Cho, M.; Choi, E.; Yang Jee, S.; Lee, C.; Seo Jeong, J.; Kim Beom, S.; Oh Soo, J.; Kim Hwan, M.; Lee, K.; Park, S. K.; Kwon Ho, J.; Han, G., Discovery of Pyridone-Based Histone Deacetylase Inhibitors: Approaches for Metabolic Stability. *ChemMedChem* **2013**, 8 (2), 272-279.
  224. Ehab AlShamaileh; Mahmoud Alawi; Yura Dahdal; Saadeh, H., Kinetic Stability Study of Selected Hydroxamic Acids using HPLC/UV. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences* **2008**, 1 (1).
  225. Choi, E.; Lee, C.; Cho, M.; Seo, J. J.; Yang, J. S.; Oh, S. J.; Lee, K.; Park, S.-K.; Kim, H. M.; Kwon, H. J.; Han, G., Property-Based Optimization of Hydroxamate-Based  $\gamma$ -Lactam HDAC Inhibitors to

Improve Their Metabolic Stability and Pharmacokinetic Profiles. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 55 (23), 10766-10770.

226. Greenlee, W. F.; Poland, A., An improved assay of 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity: induction of hepatic enzyme activity in C57BL/6J and DBA/2J mice by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1978**, 205 (3), 596.
227. Puozzo, C.; Lens, S.; Reh, C.; Michaelis, K.; Rosillon, D.; Deroubaix, X.; Deprez, D., Lack of Interaction of Milnacipran with the Cytochrome P450 Isoenzymes Frequently Involved in the Metabolism of Antidepressants. *Clinical Pharmacokinetics* **2005**, 44 (9), 977-988.
228. Wu, J. T.; Wu, L. H.; Knight, J. A., Stability of NADPH: effect of various factors on the kinetics of degradation. *Clinical Chemistry* **1986**, 32 (2), 314.
229. Hooven, L. A.; Mahadevan, B.; Keshava, C.; Johns, C.; Pereira, C.; Desai, D.; Amin, S.; Weston, A.; Baird, W. M., Effects of suberoylanilide hydroxamic acid and trichostatin A on induction of cytochrome P450 enzymes and benzo[a]pyrene DNA adduct formation in human cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, 15 (5), 1283-1287.
230. Takizawa, D.; Kakizaki, S.; Horiguchi, N.; Tojima, H.; Yamazaki, Y.; Ichikawa, T.; Sato, K.; Mori, M., Histone deacetylase inhibitors induce cytochrome P450 2B by activating nuclear receptor constitutive androstane receptor. *Drug Metab Dispos* **2010**, 38 (9), 1493-8.
231. Hřebacková, J.; Poljaková, J.; Eckschlager, T.; Hrabeta, J.; Prochazka, P.; Smutný, S.; Stiborová, M., Histone deacetylase inhibitors valproate and trichostatin A are toxic to neuroblastoma cells and modulate cytochrome P450 1A1, 1B1 and 3A4 expression in these cells. *Interdisciplinary toxicology* **2009**, 2 (3), 205-10.
232. Yamazaki, H.; Inoue, K.; Mimura, M.; Oda, Y.; Guengerich, F. P.; Shimada, T., 7-Ethoxycoumarin O-deethylation catalyzed by cytochromes P450 1A2 and 2E1 in human liver microsomes. *Biochemical Pharmacology* **1996**, 51 (3), 313-319.
233. Sangha, O., Epidemiology of rheumatic diseases. *Rheumatology* **2000**, 39 (suppl\_2), 3-12.
234. Kerlan-Candon, S.; Combe, B.; Vincent, R.; Clot, J.; Pinet, V.; Eliaou, J. F., HLA-DRB1 gene transcripts in rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Immunology* **2001**, 124 (1), 142-149.
235. Vojinovic, J.; Damjanov, N., HDAC Inhibition in Rheumatoid Arthritis and Juvenile Idiopathic Arthritis. *Molecular Medicine* **2011**, 17 (5-6), 397-403.
236. Veale, D. J.; Orr, C.; Fearon, U., Cellular and molecular perspectives in rheumatoid arthritis. *Seminars in Immunopathology* **2017**, 39 (4), 343-354.
237. Brand, D. D.; Kang, A. H.; Rosloniec, E. F., Immunopathogenesis of Collagen Arthritis. *Springer Seminars in Immunopathology* **2003**, 25 (1), 3-18.
238. Hegen, M.; Keith, J. C.; Collins, M.; Nickerson-Nutter, C. L., Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* **2008**, 67 (11), 1505.
239. Harre, U.; Schett, G., Cellular and molecular pathways of structural damage in rheumatoid arthritis. *Seminars in Immunopathology* **2017**, 39 (4), 355-363.
240. Aletaha, D.; Smolen, J., Rheumatoid Arthritis. *Zeitschrift für Rheumatologie* **2009**, 68 (1), 10-15.
241. Aletaha, D.; Neogi, T.; Silman, A. J.; Funovits, J.; Felson, D. T.; Bingham, C. O.; Birnbaum, N. S.; Burmester, G. R.; Bykerk, V. P.; Cohen, M. D.; Combe, B.; Costenbader, K. H.; Dougados, M.; Emery, P.; Ferraccioli, G.; Hazes, J. M. W.; Hobbs, K.; Huizinga, T. W. J.; Kavanaugh, A.; Kay, J.; Kvien, T. K.; Laing, T.; Mease, P.; Ménard, H. A.; Moreland, L. W.; Naden, R. L.; Pincus, T.; Smolen, J. S.; Stanislawska-Biernat, E.; Symmons, D.; Tak, P. P.; Upchurch, K. S.; Vencovský, J.; Wolfe, F.; Hawker, G., 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Annals of the Rheumatic Diseases* **2010**, 69 (9), 1580.
242. Müller-Ladner, U.; Pap, T.; Gay, R. E.; Neidhart, M.; Gay, S., Mechanisms of Disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nature Clinical Practice Rheumatology* **2005**, 1, 102.

243. Choo, Q. Y.; Ho, P. C.; Lin, H. S., Histone Deacetylase Inhibitors: New Hope for Rheumatoid Arthritis? *Current Pharmaceutical Design* **2008**, *14* (8), 803-820.
244. Christianson, C. A.; Corr, M.; Yaksh, T. L.; Svensson, C. I., K/BxN Serum Transfer Arthritis as a Model of Inflammatory Joint Pain. In *Pain Research: Methods and Protocols*, Luo, Z. D., Ed. Humana Press: Totowa, NJ, **2012**; pp 249-260.
245. Goldring, S. R., Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **2003**, *42* (suppl\_2), ii11-ii16.
246. Firestein, G. S., Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* **2003**, *423*, 356.
247. Chung, Y.-L.; Lee, M.-Y.; Wang, A.-J.; Yao, L.-F., A therapeutic strategy uses histone deacetylase inhibitors to modulate the expression of genes involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Molecular Therapy* **2003**, *8* (5), 707-717.
248. Gillespie, J.; Savic, S.; Wong, C.; Hempshall, A.; Inman, M.; Emery, P.; Grigg, R.; McDermott, M. F., Histone deacetylases are dysregulated in rheumatoid arthritis and a novel histone deacetylase 3-selective inhibitor reduces interleukin-6 production by peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis & Rheumatism* **2012**, *64* (2), 418-422.
249. Pope, R. M., Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Immunology* **2002**, *2*, 527.
250. Mourad, J.; Monem, F., HLA-DRB1 allele association with rheumatoid arthritis susceptibility and severity in Syria. *Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)* **2013**, *53* (1), 47-56.
251. Li, P.; Schwarz, E. M., The TNF- $\alpha$  transgenic mouse model of inflammatory arthritis. *Springer Seminars in Immunopathology* **2003**, *25* (1), 19-33.
252. Weissmann, G., Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol* **2004**, *10* (3 Suppl), S26-31.
253. Edwards, J. C. W.; Cambridge, G., B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nature Reviews Immunology* **2006**, *6*, 394.
254. Williams, R. C., Immunopathology of Rheumatoid Arthritis. *Hospital Practice* **1978**, *13* (2), 53-60.
255. McInnes, I. B.; Schett, G., The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *The New England Journal of Medicine* **2011**, *365* (23), (graphische Darstellung durch Tony Murphy).
256. Hasler, P.; Gabay, C., Rheumatoid arthritis: from basic findings and clinical manifestations to future therapies. *Seminars in Immunopathology* **2017**, *39* (4), 339-341.
257. Alp  zar-Rodríguez, D.; Finckh, A., Environmental factors and hormones in the development of rheumatoid arthritis. *Seminars in Immunopathology* **2017**, *39* (4), 461-468.
258. Wollbold, J.; Huber, R.; Kinne, R.; Wolff, K. E., Conceptual Representation of Gene Expression Processes. 2007; p (graphische Darstellung durch Tony Murphy).
259. Keffer, J.; Probert, L.; Cazlaris, H.; Georgopoulos, S.; Kaslaris, E.; Kioussis, D.; Kollias, G., Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *The EMBO Journal* **1991**, *10* (13), 4025-4031.
260. Smolen, J. S.; Aletaha, D.; McInnes, I. B., Rheumatoid arthritis. *The Lancet* **2016**, *388*, 2023-2038.
261. Iwanaga, T.; Shikichi, M.; Kitamura, H.; Yanase, H.; Nozawa-Inoue, K., Morphology and Functional Roles of Synoviocytes in the Joint. *Archives of Histology and Cytology* **2000**, *63* (1), 17-31.
262. Lee, D. M.; Weinblatt, M. E., Rheumatoid arthritis. *The Lancet* **2001**, *358* (9285), 903-911.
263. Grabiec, A. M.; Korchynskyi, O.; Tak, P. P.; Reedquist, K. A., Histone deacetylase inhibitors suppress rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte and macrophage IL-6 production by accelerating mRNA decay. *Annals of the Rheumatic Diseases* **2012**, *71* (3), 424.
264. AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG Pathogenese der rheumatoiden Arthritis. (graphische Darstellung durch Tony Murphy).
265. Fox, D. A., The role of T cells in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. New perspectives. *Arthritis & Rheumatism* **1997**, *40* (4), 598-609.
266. Bottini, N.; Firestein, G., Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: Passive responders and imprinted aggressors. *Nature Reviews Rheumatology* **2013**, *9* (1), 24-33.



267. Mauri, C.; Ehrenstein, M. R., Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. B cells. *Arthritis Research & Therapy* **2007**, *9* (2), 205.
268. Lundy, S. K.; Sarkar, S.; Tesmer, L. A.; Fox, D. A., Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. *Arthritis Research & Therapy* **2007**, *9* (1), 202.
269. Lutzky, V.; Hannawi, S.; Thomas, R., Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Dendritic cells. *Arthritis Research & Therapy* **2007**, *9* (4), 219.
270. Bendele, A. M., Animal models of rheumatoid Arthritis. *Musculoskel Neuron Interact* **2001**, *1* (4), 377-385.
271. Glant, T. T.; Mikecz, K.; Arzoumanian, A.; Poole, A. R., Proteoglycan-induced arthritis in balb/c mice. *Arthritis & Rheumatism* **1987**, *30* (2), 201-212.
272. Schubert, D.; Maier, B.; Morawietz, L.; Krenn, V.; Kamradt, T., Immunization with Glucose-6-Phosphate Isomerase Induces T Cell-Dependent Peripheral Polyarthritis in Genetically Unaltered Mice. *The Journal of Immunology* **2004**, *172* (7), 4503.
273. De Castro Costa, M.; De Sutter, P.; Gybels, J.; Van Hees, J., Adjuvant-induced arthritis in rats: A possible animal model of chronic pain. *Pain* **1981**, *10* (2), 173-185.
274. Christensen, A. D.; Haase, C.; Cook, A. D.; Hamilton, J. A., K/BxN Serum-Transfer Arthritis as a Model for Human Inflammatory Arthritis. *Frontiers in Immunology* **2016**, *7*, 213.
275. Kyburz, D.; Corr, M., The KRN mouse model of inflammatory arthritis. *Springer Seminars in Immunopathology* **2003**, *25* (1), 79-90.
276. Trentham, D. E.; Townes, A. S.; Kang, A. H., Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *The Journal of Experimental Medicine* **1977**, *146* (3), 857.
277. Courtenay, J. S.; Dallman, M. J.; Dayan, A. D.; Martin, A.; Mosedale, B., Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* **1980**, *283*, 666.
278. Heidari, B., Rheumatoid Arthritis: Early diagnosis and treatment outcomes. *Caspian Journal of Internal Medicine* **2011**, *2* (1), 161-170.
279. Schett, G.; Stach, C.; Zwerina, J.; Voll, R.; Manger, B., How antirheumatic drugs protect joints from damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* **2008**, *58* (10), 2936-2948.
280. Smolen, J. S.; Steiner, G., Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov* **2003**, *2* (6), 473-88.
281. Schaffer, D.; Florin, T.; Eagle, C.; Marschner, I.; Singh, G.; Grobler, M.; Fenn, C.; Schou, M.; Curnow, K. M., Risk of Serious NSAID-Related Gastrointestinal Events during Long-Term Exposure: A Systematic Review. *Med.J.Aust.* **2006**, *185* (9), 501-506.
282. Dinarello, C. A.; Fossati, G.; Mascagni, P., Histone Deacetylase Inhibitors for Treating a Spectrum of Diseases Not Related to Cancer. *Molecular Medicine* **2011**, *17* (5-6), 333-352.
283. Donahue, K. E.; Gartlehner, G.; Jonas, D. E.; et al., Systematic review: Comparative effectiveness and harms of disease-modifying medications for rheumatoid arthritis. *Annals of Internal Medicine* **2008**, *148* (2), 124-134.
284. Ravindran, V.; Rachapalli, S.; Choy, E. H., Safety of medium- to long-term glucocorticoid therapy in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatology* **2009**, *48* (7), 807-811.
285. Toussiot, É.; Khan, K. A.; Herbein, G., Histone deacetylase inhibitors: a new and promising drug class for the treatment of arthritis? *Clinical Epigenetics* **2010**, *1* (1-2), 3-6.
286. Santo, L.; Hideshima, T.; Kung, A. L.; Tseng, J.-C.; Tamang, D.; Yang, M.; Jarpe, M.; van Duzer, J. H.; Mazitschek, R.; Ogier, W. C.; Cirstea, D.; Rodig, S.; Eda, H.; Scullen, T.; Canavese, M.; Bradner, J.; Anderson, K. C.; Jones, S. S.; Raje, N., Preclinical activity, pharmacodynamic, and pharmacokinetic properties of a selective HDAC6 inhibitor, ACY-1215, in combination with bortezomib in multiple myeloma. *Blood* **2012**, *119* (11), 2579.
287. Kannan, K.; Ortmann, R. A.; Kimpel, D., Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology* **2005**, *12* (3), 167-181.
288. Joe, B.; Griffiths, M. M.; Remmers, E. F.; Wilder, R. L., Animal models of rheumatoid arthritis and related inflammation. *Current Rheumatology Reports* **1999**, *1* (2), 139-148.
289. Billiau, A.; Matthys, P., Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *Journal of Leukocyte Biology* **2001**, *70* (6), 849-860.

290. Freund, J., The effect of paraffin oil and myco-bacteria on antibody formation and sensitization *Am.J.Clin.Pathol.* **1951**, 21 (7), 645-656.
291. Trentham David, E., Collagen arthritis as a relevant model for rheumatoid arthritis. evidence pro and con. *Arthritis & Rheumatism* **1982**, 25 (8), 911-916.
292. Terato, K.; Hasty, K. A.; Cremer, M. A.; Stuart, J. M.; Townes, A. S.; Kang, A. H., Collagen-induced arthritis in mice. Localization of an arthritogenic determinant to a fragment of the type II collagen molecule. *The Journal of Experimental Medicine* **1985**, 162 (2), 637-646.
293. Stuart, J. M.; Townes, A. S.; Kang, A. H., Nature and specificity of the immune response to collagen in type II collagen-induced arthritis in mice. *Journal of Clinical Investigation* **1982**, 69 (3), 673-683.
294. Myers, L. K.; Rosloniec, E. F.; Cremer, M. A.; Kang, A. H., Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity. *Life Sciences* **1997**, 61 (19), 1861-1878.
295. Zheng, C.; Levenston, M. E., Fact versus artifact: Avoiding erroneous estimates of sulfated glycosaminoglycan content using the dimethylmethylene blue colorimetric assay for tissue-engineered constructs. *European cells & materials* **2015**, 29, 224-236.
296. Roth, H. J.; Müller, C. E.; Folkers, G., *Stereochemie und Arzneistoffe*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, **1998**.
297. Roth, H. J., Dex-, Lev-, Ar-, Es-, Rac-, neue "reine" Arzneistoffe-Bilanz der letzten fünf Jahre. *Deutsche Apothekerzeitung* 2009, pp 3182-3186.
298. M Evans, A., Comparative Pharmacology of S(+)-Ibuprofen and (RS)-Ibuprofen. *Clinical Rheumatology* **2001**, 20 Suppl 1, S9-14.
299. Davies, N. M., Clinical Pharmacokinetics of Ibuprofen. *Clinical Pharmacokinetics* **1998**, 34 (2), 101-154.
300. Wünsch, B., Die bessere Hälfte bewährter Arzneistoffe. *Pharmazeutische Zeitung* 2005.
301. Roth, H. J., Dex-, Lev-, Es-, eine Bilanz der letzten fünf Jahre: Trend zur Applikation reiner Enantiomere. *Deutsche Apothekerzeitung* 2004.
302. Vishwakarma, S.; Iyer, L. R.; Muley, M.; Singh, P. K.; Shastry, A.; Saxena, A.; Kulathingal, J.; Vijaykanth, G.; Raghu, J.; Rajesh, N.; Rathinasamy, S.; Kachhadia, V.; Kilambi, N.; Rajgopal, S.; Balasubramanian, G.; Narayanan, S., Tubastatin, a selective histone deacetylase 6 inhibitor shows anti-inflammatory and anti-rheumatic effects. *International Immunopharmacology* **2013**, 16 (1), 72-78.
303. Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A., NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *The Journal of Organic Chemistry* **1997**, 62 (21), 7512-7515.
304. Hasselstrom, T.; Hopkins, S., Nitration of Sulfodehydroabietic Acid. *The Journal of the American Chemical Society* **1941**, 63, 421-422.
305. Kirby, A. J.; Davies, J. E.; Fox, D. J.; Hodgson, D. R. W.; Goeta, A. E.; Lima, M. F.; Priebe, J. P.; Santaballa, J. A.; Nome, F., Ammonia oxide makes up some 20% of an aqueous solution of hydroxylamine. *Chemical Communications* **2010**, 46 (8), 1302-1304.
306. Maier, T. B., T.; Hesslinger, C. Novel N-Substituted Tetrahydroisoquinoline/Isoindoline Hydroxamic Acid Compounds. WO002009112550A4, September 17, **2009**.
307. Sui, Y. L., L.; Wang, D.; Chen, Y.-J., An Efficient Synthetic Method to Nonnatural  $\alpha$ - and  $\beta$ -Tryptophan Analogues via Friedel-Crafts Alkylation of Indoles with Nitroacrylates. *Chinese Journal of Chemistry* **2007**, 25, 977-985.
308. Gwaltney, S. L.; Imade, H. M.; Barr, K. J.; Li, Q.; Gehrke, L.; Credo, R. B.; Warner, R. B.; Lee, J. Y.; Kovar, P.; Wang, J.; Nukkala, M. A.; Zielinski, N. A.; Frost, D.; Ng, S.-C.; Sham, H. L., Novel sulfonate analogues of combretastatin A-4: potent antimitotic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2001**, 11 (7), 871-874.
309. Stefani, H. A.; Vasconcelos, S. N. S.; Souza, F. B.; Manarin, F.; Zukerman-Schpector, J., One-pot three-component synthesis of indole-3-glyoxyl derivatives and indole-3-glyoxyl triazoles. *Tetrahedron Letters* **2013**, 54 (43), 5821-5825.
310. Carmen de la Fuente, M.; Domínguez, D., Normal electron demand Diels-Alder cycloaddition of indoles to 2,3-dimethyl-1,3-butadiene. *Tetrahedron* **2011**, 67 (22), 3997-4001.

311. Padwa, A.; Brodney, M. A.; Lynch, S. M.; Rashatasakhon, P.; Wang, Q.; Zhang, H., A New Strategy toward Indole Alkaloids Involving an Intramolecular Cycloaddition/Rearrangement Cascade. *The Journal of Organic Chemistry* **2004**, *69* (11), 3735-3745.
312. Ye, Q.; Li, M.; Zhou, Y.; Pang, T.; Xu, L.; Cao, J.; Han, L.; Li, Y.; Wang, W.; Gao, J.; Li, J., Synthesis and biological evaluation of 3-benzisoxazolyl-4-indolylmaleimides as potent, selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 $\beta$ . *Molecules* **2013**, *18* (5), 5498-516.
313. Markey, S. J.; Lewis, W.; Moody, C. J., A New Route to  $\alpha$ -Carbolines Based on 6 $\pi$ -Electrocyclization of Indole-3-alkenyl Oximes. *Organic Letters* **2013**, *15* (24), 6306-6308.
314. Lopchuk, J. M. G., I.L.; Badenock, J.C.; Gribble, G.W., A Short, Protecting Group-Free Total Synthesis of Bruceollines D, E, and J. *The Organic Letters* **2013**, *15* (17), 4485-4487.
315. Murai, Y.; Masuda, K.; Sakihama, Y.; Hashidoko, Y.; Hatanaka, Y.; Hashimoto, M., Comprehensive Synthesis of Photoreactive (3-Trifluoromethyl)diaziriny Indole Derivatives from 5- and 6- Trifluoroacetylindoles for Photoaffinity Labeling. *The Journal of Organic Chemistry* **2012**, *77* (19), 8581-8587.
316. Trost, B. M.; Müller, C., Asymmetric Friedel–Crafts Alkylation of Pyrroles with Nitroalkenes Using a Dinuclear Zinc Catalyst. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (8), 2438-2439.
317. Sarkisyan, Z. M.; Makarenko, S. V.; Berestovitskaya, V. M.; Deiko, L. I.; Berkova, G. A., Synthesis of Indolyl Nitroethylphosphonates and Indolyl Nitronitropropanoates. *Russian Journal of General Chemistry* **2003**, *73* (8), 1328-1330.
318. Bold, G.; Frei, J.; Lang, M.; Traxler, P.; Furet, P. Fused Pyrazole Derivatives and Processes for their Preparation. **1998**.
319. Mahboobi, S.; Teller, S.; Pongratz, H.; Hufsky, H.; Sellmer, A.; Botzki, A.; Uecker, A.; Beckers, T.; Baasner, S.; Schächtele, C.; Überall, F.; Kassack, M. U.; Dove, S.; Böhmer, F.-D., Bis(1H-2-indolyl)methanones as a Novel Class of Inhibitors of the Platelet-Derived Growth Factor Receptor Kinase. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45* (5), 1002-1018.
320. Tsuji, N.; Kobayashi, M.; Nagashima, K.; Wakisaka, Y.; Koizumi, K., A new antifungal Antibiotic, Trichostatin. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)* **1976**, *29* (1), 1-6.
321. Azechi, T.; Kanehira, D.; Kobayashi, T.; Sudo, R.; Nishimura, A.; Sato, F.; Wachi, H., Trichostatin A, an HDAC Class I/II Inhibitor, Promotes Pi-Induced Vascular Calcification Via Up-Regulation of the Expression of Alkaline Phosphatase. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* **2013**, *20* (6), 538-547.
322. Qi, X.; Wang, P., Class IIa HDACs inhibitor TMP269 promotes M1 polarization of macrophages after spinal cord injury. *Journal of Cellular Biochemistry* **2017**, *119* (4), 3081-3090.
323. Bradner, J. E.; West, N.; Grachan, M. L.; Greenberg, E. F.; Haggarty, S. J.; Warnow, T.; Mazitschek, R., Chemical phylogenetics of histone deacetylases. *Nature Chemical Biology* **2010**, *6*, 238.
324. Strober, W., Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology* **2001**, *21* (1), A.3B.1-A.3B.2.
325. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **1976**, *72* (1), 248-254.
326. Hill Jeanette, R., In Vitro Drug Metabolism Using Liver Microsomes. *Current Protocols in Pharmacology* **2004**, *23* (1), 7.8.1-7.8.11.
327. Farndale, R. W.; Buttle, D. J.; Barrett, A. J., Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1986**, *883* (2), 173-177.
328. Marenzana, M.; Vugler, A.; Moore, A.; Robinson, M., Effect of sclerostin-neutralising antibody on periarticular and systemic bone in a murine model of rheumatoid arthritis: a microCT study *Arthritis Research & Therapy* **2013**, *15* (5), R125.
329. Kato, G.; Shimizu, Y.; Arai, Y.; Suzuki, N.; Sugamori, Y.; Maeda, M.; Takahashi, M.; Tamura, Y.; Wakabayashi, N.; Murali, R.; Ono, T.; Ohya, K.; Mise-Omata, S.; Aoki, K., The inhibitory effects of a RANKL-binding peptide on articular and periarticular bone loss in a murine model of collagen-induced arthritis: a bone histomorphometric study. *Arthritis Res Ther* **2015**, *17*, 251.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, im Dezember 2018

---

(Elisabeth Grünstein)